

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MONICA SUREK

ASPECTOS DA ADESÃO DE *AEROMONAS* A LINHAGENS CELULARES  
IMORTALIZADAS

CURITIBA

2014

MONICA SUREK

ASPECTOS DA ADESÃO DE *AEROMONAS* A LINHAGENS CELULARES  
IMORTALIZADAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Cyntia Maria Telles Fadel Picheth

Coorientadora: Profa. Dra. Katia Sabrina Paludo

CURITIBA

2014

Surek, Monica

Aspectos da adesão de aeromonas a linhagens celulares imortalizadas

/ Monica Surek – Curitiba, 2014.

100 f. : il (algumas color.) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Cyntia Maria Telles Fadel Picheth

Coorientadora: Professora Dra. Katia Sabrina Paludo

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2014.

Inclui bibliografia

1. Aeromonas. 2. Adesão. 3. Citotoxicidade. I. Picheth, Cyntia Maria Telles Fadel. II. Paludo, Katia Sabrina. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 616.014


## TERMO DE APROVAÇÃO


**MONICA SUREK**


Título: **"ASPECTOS DA ADESÃO DE AEROMONAS A LINHAGENS CELULARES IMORTALIZADAS"**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Análises Clínicas.

  
Prof.ª Dr.ª Cyntia Maria Telles Fadel Picheth  
Orientadora

  
Prof.ª Dr.ª Katia Sabrina Paludo  
Co-orientadora

  
Prof.ª Dr.ª Wanda Moscalewski Abrahão  
Universidade Federal do Paraná

  
Prof. Dr. Geraldo Picheth  
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 19 de fevereiro de 2014.

## RESUMO

As 42 estirpes de *Aeromonas* foram capazes de aderir sobre células das linhagens HeLa e HRT-1, mas diferem em relação ao número de bactérias aderidas às células e número de células infectadas. A maioria das estirpes (33 em HeLa e 36 em HRT-18) apresentou baixo nível de adesão (<10 bactéria/célula). Foram observados dois perfis de adesão, agregativo e difuso, este observado em 28 das 42 estirpes. Para todas as estirpes o mesmo perfil de adesão foi observado em ambas as linhagens celulares. As estirpes variaram quanto à capacidade de causar efeitos citotóxicos, e também em relação ao efeito provocado em células das linhagens HRT-18 e HeLa, sendo esta última mais sensível aos produtos tóxicos gerados por *Aeromonas*. As alterações celulares variaram de arredondamento discreto, vacuolização, formação de *blebs* a desadesão celular. *Aeromonas* com genótipos de virulência distintos provocaram efeitos citotóxicos similares, sugerindo que não há uma relação direta entre os genes de virulência identificados e citotoxicidade nas condições de estudo. Entre as 8 estirpes para as quais testes adicionais foram realizados apenas AH 297M provocou hemaglutinação, sugerindo que essas bactérias diferem em relação às moléculas associadas com adesão. Ensaio de competição com carboidratos, tratamento com tripsina e metaperiodato de sódio causaram redução na adesão de uma ou mais estirpes, sugerindo que essas bactérias provavelmente apresentam adesinas distintas que reconhecem receptores diferentes em HeLa e HRT-18. Seis das 8 estirpes de *Aeromonas* aderiram ao Matrigel, reforçando a sugestão de que as estirpes apresentam diferentes tipos de moléculas de adesão na sua superfície.

Palavras-chave: *Aeromonas*. Adesão. Citotoxicidade.

## ABSTRACT

Forty two strains of *Aeromonas* were able to adhere on cells of HeLa and HRT-18 lineages, but differed in relation to the number of bacteria attached to the cells and the number of infected cells. Most strains (33 in HeLa and 36 in HRT- 18) showed low level of adherence (<10 bacteria/cell). Two patterns of adhesion were observed, aggregative and diffuse, the last was observed in 28 of the 42 strains. For all strains the same pattern of adhesion was observed in both cell lines. Strains varied in their ability to cause cytotoxic effects, and also in relation to the effect caused in HRT-18 and HeLa cells, the last lineage was more sensitive to the toxic products produced by *Aeromonas*. Cellular changes ranged from slight rounding, vacuolization, bleb formation and cell detachment. *Aeromonas* with different virulence genotypes caused similar cytotoxic effects, suggesting that there was not a direct relationship between the virulence genes identified and cytotoxicity under the study conditions. Among the 8 strains for which additional tests were performed, only AH 297M caused hemagglutination, suggesting that these bacteria differ with respect to molecules associated with adhesion. Competition assays with carbohydrate, treatment with trypsin and sodium metaperiodate caused reduction in the adhesion of one or more strains, suggesting that these bacteria probably have different adhesins that recognize different receptors in HeLa and HRT- 18 cells. Six of the eight strains of *Aeromonas* adhered to Matrigel, strengthening the suggestion that these strains exhibit different adhesion molecules on their surface.

Key words: *Aeromonas*. Adhesion. Cytotoxicity.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por ter me concedido saúde e por me presentear com uma maravilhosa família. Agradeço à minha mãe Arlete e ao meu pai Francisco por todo o amor, apoio e por sempre estar presente e torcendo por minhas conquistas.

Às minhas orientadoras Profa. Dra. Cyntia Maria Telles Fadel Picheth e Profa. Dra. Katia Sabrina Paludo por todo o apoio, ajuda e confiança depositada em mim.

Aos professores Giovane Fávero, Sílvio Zanatta, Sílvio Sanches Veiga e Almeriane Weffort Santos por auxílios prestados.

A todos meus amigos Irene, Sidnei e Clari que contribuíram com sua amizade nos bons e maus momentos durante esta caminhada.

Agradeço à Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, à CAPES e à Fundação Araucária pela oportunidade de realizar o meu projeto.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

GRÁFICO 1 – EFEITO DOS MEIOS DE CULTIVO E MANUTENÇÃO CELULAR NO NÚMERO DE BACTÉRIAS ADERIDAS EM CÉLULAS HRT-18.....	49
FIGURA 1 - MORFOLOGIA TÍPICA DAS LINHAGENS CELULARES HELA E HRT-18 EM CULTURA. ....	50
FIGURA 2 - ADESÃO DE <i>AEROMONAS</i> EM CULTURAS DE CÉLULAS HELA (A) E HRT-18 (B).....	51
FIGURA 3 – ADESÃO DO TIPO AGREGATIVA DE EAEC 2391.....	58
FIGURA 4 – ADESÃO DO TIPO LOCALIZADA DE EPEC E234.....	59
FIGURA 5 – ADESÃO DO TIPO DIFUSA DE DAEC C1845.....	59
FIGURA 6 - PADRÃO DE ADESÃO DIFUSO E AGREGATIVO DE <i>AEROMONAS</i> .....	61
FIGURA 7 – ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS OBSERVADAS EM CÉLULAS HELA E HRT-18.....	65
FIGURA 8 – ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS OBSERVADAS EM CÉLULAS HRT-18.....	66
GRÁFICO 2 - ADESÃO DE ESTIRPES DE <i>AEROMONAS</i> SOBRE MATRIGEL	83



## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – CARACTERÍSTICAS DAS ESTIRPES DE <i>AEROMONAS</i> ESTUDADAS.....	38
QUADRO 2 – COMPOSIÇÃO DO PBS .....	41
QUADRO 3 – COMPOSIÇÃO DO HBSS .....	41
QUADRO 4 – COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO DE ALSEVER .....	45
QUADRO 5 – PERFIS DE ADESÃO DE ESTIRPES DE <i>AEROMONAS</i> .....	62
QUADRO 6 – ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS PROVOCADAS POR ESTIRPES DE <i>AEROMONAS</i> SOBRE CÉLULAS HELA E HRT-18.....	67

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ADESÃO DE <i>AEROMONAS</i> EM LINHAGENS CELULARES.....	44
TABELA 2 – CARACTERIZAÇÃO DA ADESÃO DE ESTIRPES DE <i>AEROMONAS</i> SEGUNDO O ÍNDICE BC.....	47
TABELA 3 - PERFIL DE ADESÃO DE ESPÉCIES DE <i>AEROMONAS</i> .....	55
TABELA 4 - EFEITOS CITOTÓXICOS CAUSADOS POR ESPÉCIES DE <i>AEROMONAS</i> .....	66
TABELA 5 - EFEITO DA ADIÇÃO DOS CARBOIDRATOS NA ADESÃO.....	68
TABELA 6- EFEITO DO TRATAMENTO COM TRIPSINA NA ADESÃO DAS ESTIRPES BACTERIANAS.....	69
TABELA 7 - EFEITO DO TRATAMENTO COM METAPERIODATO DE SÓDIO NA ADESÃO DAS ESTIRPES BACTERIANAS.....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>act</i>	- Gene codificador da enterotoxina citotóxica
<i>aer</i> , <i>aerA</i>	- Genes codificadores de hemolisinas Aer e AerA
<i>alt</i>	- Gene codificador da enterotoxina citotônica termolábil
<i>ast</i>	- Gene codificador da enterotoxina citotônica termoestável
AMP <sub>c</sub>	– Adenosina monofosfato cíclico
<i>ascV</i> e <i>ascFG</i>	- Genes marcadores para o sistema de secreção tipo três
ATCC	– <i>American Type Culture Collection</i>
BHI	– <i>Brain heart infusion broth</i>
Caco–2	– Célula epitelial de adenocarcinoma de cólon
CHO	– Célula de ovário de hamster chinês
DNA	– Ácido desoxirribonucleico
<i>ela</i>	- Gene codificador de elastase
HeLa	– Célula epitelial de adenocarcinoma cervical
Henle - 407	– Célula epitelial intestinal embrionária
HEp–2	– Célula epitelial derivada da HeLa
<i>hlyA</i>	- Gene codificador de hemolisina
HRT–18	– Célula epitelial de adenocarcinoma de cólon
HT–29	– Célula epitelial de adenocarcinoma de cólon
<i>lip</i>	- Gene codificador de lipase
LPS	– Lipopolissacarídeo
Omp	– Proteína de membrana externa
PBS	– <i>Phosphate buffered saline</i>
PFGE	– <i>Pulsed field gel electrophoresis</i>
PGE <sub>2</sub>	– Prostaglandina E <sub>2</sub>
rDNA	– Gene codificador de RNA ribossomal

RPMI – 1640    - *Roswell Park Memorial Institute medium*

SST3            - Sistema secretor tipo três

SST6            - Sistema secretor tipo seis

TSA             - Ágar tríptico de soja

*vasH*           - Gene marcador para o sistema de secreção tipo seis

## LISTA DE SÍMBOLOS

CO <sub>2</sub>	– Dióxido de carbono
°C	– Graus Celsius
h	– Hora
kDa	– Quilodalton
mg	– Miligrama
M	– Molar
mL	- Mililitro
min	– Minuto
nm	– Nanômetro
pH	– Potencial hidrogeniônico
rpm	– Rotação por minuto
µL	- Microlitro
UI	– Unidade internacional
UFC	- Unidade formadora de colônia

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
2.1 FATORES DE VIRULÊNCIA BACTERIANOS.....	17
2.1.1 Toxinas.....	18
2.1.1.1 Exotoxinas.....	18
2.1.1.2 Endotoxinas.....	19
2.1.2 Sistemas de secreção.....	20
2.1.3 Adesinas.....	21
2.1.4 Camada S.....	23
2.1.5 Cápsula.....	23
2.1.6 Flagelo.....	23
2.1.7 Sideróforos.....	24
2.2 <i>AEROMONAS</i> spp.....	25
2.2.1 Características gerais.....	25
2.2.2 Habitat e transmissão.....	26
2.2.3 Infecções causadas por <i>Aeromonas</i> .....	26
2.2.4 Fatores de virulência associados com <i>Aeromonas</i> .....	29
2.2.4.1 Toxinas.....	29
2.2.4.2 Sistemas de secreção associados com virulência de <i>Aeromonas</i> .....	30
2.2.4.3 Adesinas.....	31
2.2.4.4 Enzimas secretadas.....	33
2.2.4.5 Camada S.....	33
2.2.4.6 Cápsula.....	33
2.2.4.7 Flagelo.....	34
2.2.4.8 Lipopolissacarídio.....	35
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
4.1 AMOSTRA.....	37
4.2 LINHAGENS CELULARES UTILIZADAS NOS ENSAIOS.....	39
4.3 ENSAIOS DE ADESÃO.....	39

4.3.1 Reativação das bactérias.....	39
4.3.2 Reativação e manutenção das linhagens celulares.....	40
4.3.3 Ensaio de adesão celular.....	40
4.3.4 Critérios para determinação da adesão bacteriana.....	42
4.3.5 Perfil de adesão.....	42
4.3.6 Avaliação da produção de efeitos citotóxicos.....	43
4.4 DETERMINAÇÃO DE FATORES ASSOCIADOS COM ADESÃO.....	43
4.4.1 Competição com carboidratos.....	43
4.4.2 Tratamento com tripsina.....	43
4.4.3 Tratamento com metaperiodato de sódio.....	44
4.4.4 Ensaio de hemaglutinação.....	45
4.4.5 Inibição da hemaglutinação.....	45
4.5 ADESÃO SOBRE MATRIZ EXTRACELULAR.....	46
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>48</b>
5.1 ENSAIOS DE ADESÃO.....	48
5.1.1 Ensaio de adesão de <i>Aeromonas</i> em células HeLa e HRT-18.....	50
5.1.2 Perfil de adesão.....	58
5.1.3 Produção de efeitos citotóxicos.....	64
5.2 EFEITO DA COMPETIÇÃO COM CARBOIDRATOS NA ADESÃO.....	74
5.3 EFEITO DA TRIPSINA SOBRE A ADESÃO DE <i>AEROMONAS</i> EM CÉLULAS HELA E HRT-18.....	77
5.4 EFEITO DO METAPERIODATO DE SÓDIO SOBRE A ADESÃO DE <i>AEROMONAS</i> EM CÉLULAS HELA E HRT-18.....	78
5.5 HEMAGLUTINAÇÃO.....	80
5.6 ADESÃO SOBRE MATRIZ EXTRACELULAR.....	82
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>86</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>87</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Aeromonas* são bacilos gram negativos, anaeróbios facultativos, oxidase positivos e fermentadores da glucose. São encontrados predominantemente em ambientes aquáticos e são capazes de causar uma ampla variedade de infecções em humanos (JANDA e ABBOTT, 2010; PARKER e SHAW, 2011).

*Aeromonas* produzem uma variedade de produtos extracelulares tóxicos que contribuem para a patogênese, incluindo hemolisinas e enterotoxinas. Entre as estruturas de superfície associadas com virulência, além do lipopolissacarídeo e proteínas de membrana externa, podem apresentar cápsula, camada S, *pili*, flagelos e sistemas de secreção tipo III e tipo VI (CHOPRA et al., 2009). No entanto, o mecanismo de patogênese dessas bactérias é complexo e ainda pouco compreendido (JANDA e ABBOTT, 2010; PUTHUCHEARY, PUAH e CHUA, 2012).

A aderência do micro-organismo à superfície celular é o primeiro passo na patogênese da maioria das infecções bacterianas. A adesão reflete uma interação específica entre um ligante na superfície bacteriana e um receptor na superfície das células epiteliais do hospedeiro. Este processo pode ser estudado *in vitro* utilizando cultivo celular, um modelo simples para a investigação de interações bactéria – hospedeiro, incluindo os mecanismos de adesão da bactéria às células, a identificação do fenótipo de aderência e os eventos que ocorrem após a bactéria se associar com a célula hospedeira, como a capacidade de invadir estas células (ALBERT, GRANT e ROBINS-BROWNE, 2000).

A adesão em *Aeromonas* é ainda pouco compreendida, embora vários fatores possam estar associados com esse processo (THORNLEY et al., 1997; TABEL et al., 2009). Entre esses fatores estão os *pili*, estruturas proteicas filamentosas que se projetam da superfície bacteriana e ligam-se a receptores específicos estabelecendo contato entre a célula bacteriana e a célula hospedeira (SALYERS e WHITT, 2002; WILSON et al., 2002). As adesinas afimbriais que são proteínas de membrana externa que não formam a estrutura filamentosa, também foram implicadas na adesão de *Aeromonas* (ROCHA DE SOUZA et al., 2001; NAMBA et al., 2008). Além



dessas adesinas, o antígeno O do lipopolissacarídio e o flagelo polar também contribuem para a adesão em *Aeromonas* (THORNLEY et al., 1997; TABELI et al., 2009). No entanto, nenhum receptor é conhecido.

Metodologias úteis para o estudo de fatores associados com a adesão incluem a utilização de ensaios de competição com carboidratos, para determinar se a presença de carboidratos no meio interfere na adesão e identificar possíveis componentes de receptores celulares (NISHIKAWA et al., 1994); o tratamento prévio das estirpes bacterianas com enzimas proteolíticas que podem clivar estruturas proteicas envolvidas na adesão (CARRELLO et al., 1988); ou a utilização de substâncias oxidantes que permitem verificar a participação de carboidratos presentes na superfície bacteriana no processo de adesão (THORNLEY et al., 1996).

Visando contribuir para o conhecimento da patogênese de *Aeromonas*, o objetivo desse estudo é analisar a adesão de estirpes de *Aeromonas* isoladas de amostras clínicas humanas a linhagens celulares *in vitro*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

O contato patógeno-hospedeiro é fundamental para o desenvolvimento de uma infecção. As células epiteliais da mucosa geralmente representam o local de contato inicial para os patógenos. Uma vez aderidos às células da mucosa, os patógenos podem se comportar de formas diferentes. Alguns permanecem localizados na superfície celular sem invadir ou se disseminar sistemicamente, enquanto outros são capazes de romper barreiras do hospedeiro, especialmente revestimentos epiteliais e endoteliais que constituem a defesa primária contra a invasão bacteriana (FINLAY e SIEBERS, 1995).

As superfícies mucosas possuem vários mecanismos de defesa que previnem a colonização e invasão bacterianas, tais como a ação de varredura do epitélio ciliado do trato respiratório que remove bactérias presas no muco, e a ação mecânica contínua do peristaltismo que impulsiona as bactérias através do trato gastrointestinal. A presença da microbiota normal também representa um fator de defesa do hospedeiro, pois pode inibir a adesão de bactérias patogênicas pela ocupação dos mesmos receptores que são utilizados pelo patógeno (FINLAY e SIEBERS, 1995).

Além disso, o sistema imune desempenha um papel fundamental como mecanismo de defesa contra a sobrevivência e disseminação de patógenos no hospedeiro (FINLAY e SIEBERS, 1995; KIM et al., 2010).

De maneira a superar os mecanismos de defesa do hospedeiro e estabelecer infecção, muitas bactérias subvertem cascatas de sinalização e funções defensivas utilizando mecanismos versáteis, denominados fatores de virulência, que modulam e contornam sistemas de defesa do hospedeiro (KIM et al., 2010).

## 2.1 FATORES DE VIRULÊNCIA BACTERIANOS

O estabelecimento de uma infecção é mediado por fatores de virulência que podem ser definidos como produtos ou estratégias bacterianas que contribuem para a habilidade em causar doença. Os fatores de virulência podem ser representados por componentes estruturais ou produtos metabólicos da bactéria e podem provocar danos ao hospedeiro (WINN et al., 2006).

A habilidade de uma bactéria patogênica causar doença em um hospedeiro suscetível é determinada por múltiplos fatores de virulência atuando individualmente ou em conjunto em diferentes estágios da infecção (WU et al., 2008).

Os fatores de virulência podem ser classificados com base no seu mecanismo e função, e enquanto alguns são associados à célula, outros são extracelulares (WINN et al., 2006; WU et al., 2008), destacando-se:

- proteínas de membrana, que podem desempenhar um papel na adesão às células hospedeiras, colonização e invasão;
- proteínas secretadas que podem promover interações bactéria - célula hospedeira e modificar o ambiente da célula hospedeira (WU et al., 2008). Diferentes sistemas de secreção, designados como tipos I a VI podem ser utilizados para transportar proteínas efetoras e toxinas do citoplasma das bactérias ao meio extra-celular ou diretamente ao citoplasma da célula hospedeira (WU et al., 2008; COULTHURST, 2013);
- componentes da parede celular, como o lipopolisacarídeo (LPS) ou endotoxina pode proteger a bactéria da lise mediada pelo complemento. É capaz de ativar a via do complemento do hospedeiro e é um indutor da inflamação;
- cápsula, estrutura que circunda a célula e apresenta atividade anti-fagocítica;
- outros fatores, tais como proteínas envolvidas na formação de biofilme, o que confere uma vantagem seletiva para a persistência em condições ambientais,

resistência aos antimicrobianos e facilita a colonização do hospedeiro; produção de sideróforos, que permitem a captação de ferro, entre outros (WU et al., 2008).

### 2.1.1 Toxinas

As toxinas foram os primeiros fatores de virulência bacterianos a serem identificados e estudados, e o que levou os cientistas da época a proporem o conceito “fatores de virulência” (SALYERS e WHITT, 2002).

#### 2.1.1.1 Exotoxinas

Esse termo foi utilizado para designar proteínas bacterianas com atividade tóxica secretadas da célula, de modo a contrastar com “endotoxina” ou LPS que fica embebido na superfície bacteriana. No entanto algumas toxinas não são secretadas, mas se acumulam no interior da célula e são liberadas pela lise celular, enquanto outras são injetadas diretamente nas células do hospedeiro (SALYERS e WHITT, 2002).

As toxinas bacterianas geralmente agem distante do sítio de infecção, e podem ser proteínas únicas ou complexos oligoméricos (HENKEL, BALDWIN e BARBIERI, 2010).

As toxinas podem ser separadas em três classes com base no seu mecanismo de ação. Normalmente o primeiro passo na ação das toxinas é a ligação à célula alvo, e pode ser seguido pela internalização de uma porção da toxina (SALYERS e WHITT, 2002).

Toxinas do tipo I. Ligam-se à superfície das células hospedeiras, mas não são translocadas para o interior da mesma. São representadas pelos “superantígenos” (SALYERS e WHITT, 2002), um grupo de toxinas secretadas produzidas por um número crescente de bactérias incluindo *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp.*, *Mycoplasma arthritidis* e *Yersinia pseudotuberculosis* (HENKEL, BALDWIN e

BARBIERI, 2010). Os superantígenos se ligam ao Complexo Principal de Histocompatibilidade II (MHC II) e estimulam a interação receptores de células T/MHC II desencadeando a produção de grandes quantidades de citocinas tóxicas (SALYERS e WHITT, 2002; HENKEL, BALDWIN e BARBIERI, 2010).

Toxinas do tipo II. Atuam sobre membranas de células eucarióticas e exercem seu efeito rompendo a integridade dessas membranas. São exemplos as citotoxinas formadoras de poros, que formam canais na membrana resultando em ruptura celular, e as fosfolipases que comprometem a integridade dos fosfolipídeos da membrana. Entre as últimas há uma variedade de enzimas que recebem denominações como fosfolipases, hemolisinas e citotoxinas, mas todas atuam destruindo a integridade dos lipídeos de membrana da célula hospedeira (SALYERS e WHITT, 2002).

Toxinas do tipo III. São organizadas em domínios distintos que reconhecem receptores na superfície de células sensíveis e possuem atividade enzimática capaz de modular a ação de um alvo intracelular. São denominadas toxinas do tipo A-B, onde a porção (B) compreende uma região que reconhece e se liga a um receptor específico, e uma região que transloca o domínio A através da membrana citoplasmática; e a porção A, ou efetor, que exerce o efeito tóxico atuando sobre determinadas proteínas intracelulares. O domínio B pode conter uma única subunidade ou ser oligomérico (SALYERS e WHITT, 2002; HENKEL, BALDWIN e BARBIERI, 2010).

#### 2.1.1.2. Endotoxinas

Presentes somente nas bactérias gram negativas. Consistem de um glicolipídeo componente integral da membrana externa, o lipopolissacarídeo (LPS). Este contém uma porção lipídica denominada lipídio A que fica incorporada na membrana externa, e o *core* e o antígeno “O” ou somático, compostos por carboidratos, que se estendem para fora da superfície bacteriana. O lipídio A é a

porção tóxica da molécula e exerce seu efeito quando há lise bacteriana (SALYERS e WHITT, 2002; WU et al., 2008).

### 2.1.2 Sistemas de Secreção

Proteínas secretadas estão associadas com diversas funções celulares tais como biogênese do envelope celular, aquisição de nutrientes, motilidade, comunicação intercelular entre outras, sendo a secreção de proteínas uma função celular básica. Entretanto, entre os fatores de virulência há diversas proteínas secretadas tais como toxinas, proteínas efetoras translocadas, e as adesinas, estas encontradas entre bactérias patogênicas e ambientais. As bactérias gram-negativas apresentam vários mecanismos para a secreção de proteínas através da membrana e parede celular, designados sistemas de secreção tipos I a VI. Estes variam de estruturas relativamente simples como o sistema de secreção tipo I (SST1), composto por três subunidades que secretam apenas um substrato (GERLACH e HENSEL, 2007; KANONENBERG et al., 2013) a máquinas complexas como os sistemas de secreção tipos III, IV e VI, compostos por múltiplas subunidades e que podem translocar várias proteínas (GERLACH e HENSEL, 2007; WANDERSMAN, 2013). Além da participação nas funções celulares gerais, os sistemas de secreção também são essenciais para as bactérias patogênicas durante a interação com as células eucarióticas do hospedeiro (GERLACH e HENSEL, 2007), dentre estes destacamos os sistemas de secreção tipos III e VI.

- Sistema de Secreção Tipo III (SST3) – é um complexo molecular que permite a translocação de proteínas efetoras entre as duas membranas das bactérias gram negativas e a membrana da célula eucariótica em uma única etapa, levando à liberação de determinantes de virulência diretamente no citoplasma da célula hospedeira onde as proteínas efetoras bacterianas podem manipular cascatas de sinalização desempenhando um papel central na virulência (VILCHES et al., 2004; TOSI et al., 2013). O SST3 apresenta uma estrutura cilíndrica chamada de complexo da agulha, que apresenta similaridade com o flagelo (CORNELIS e VAN

GIJSEGEN, 2000; TOSI et al., 2013). Para este aparato translocar as proteínas efetoras na célula alvo, é necessário que haja adesão (KLINE et al., 2009).

- Sistema de Secreção Tipo VI (SST6) - é capaz de exportar proteínas efetoras diretamente para o citoplasma da célula hospedeira eucariótica, como o SST3 (SILVERMAN et al., 2012; COULTHURST, 2013). Há evidências de uma relação evolutiva entre o SST6 e a maquinaria de perfuração celular dos bacteriófagos, a qual é utilizada para injetar o DNA viral na célula bacteriana. O SST6 é formado por uma estrutura em forma de agulha, que é inserida na membrana da célula alvo e através da qual são liberadas as proteínas efetoras (BÖNEMANN, PIETROSIUK e MOGK, 2010; COULTHURST, 2013).

### 2.1.3 Adesinas

A adesão de bactérias patogênicas à receptores específicos na superfície de células do hospedeiro é frequentemente o primeiro passo no estabelecimento de uma infecção, e uma etapa crítica na patogênese. Permite à bactéria resistir às forças mecânicas de clareamento, persistir e proliferar no hospedeiro, e iniciar os processos que resultam em doença (KLEMM e SCHEMBRI, 2000; WILSON et al., 2002; BOYLE e FINLAY, 2003).

A adesão é mediada por estruturas de superfície que podem ser classificadas em duas classes principais, as adesinas fimbriais e as afimbriais. Muitas bactérias podem expressar diferentes adesinas na sua superfície, o que lhes permite a adaptação a diferentes condições ambientais ou, no caso das bactérias patogênicas, à diferentes hospedeiros ou tecidos hospedeiros (GERLACH e HENSEL, 2007).

- Adesinas fimbriais - As fímbrias são apêndices que se projetam da superfície bacteriana como estruturas filamentosas compostas por um arranjo ordenado de uma única subunidade proteica denominada pilina. A fímbria é uma estrutura longa,

flexível e se estende além da superfície celular. Atua estabelecendo o contato entre a superfície bacteriana e a superfície da célula hospedeira.

Geralmente uma única proteína serve como a principal subunidade fimbrial, mas outras subunidades de proteínas também desempenham função estrutural na extremidade e na base da fímbria. A extremidade da fímbria medeia a aderência da bactéria à receptores específicos presentes na superfície da célula hospedeira. Tais receptores são frequentemente resíduos de carboidratos presentes em glicoproteínas e glicolipídios. Estas moléculas no hospedeiro estão frequentemente envolvidas na localização celular, mediando contato célula-célula, ou servindo como parte de um mecanismo transdutor de sinal (SALYERS e WHITT, 2002; WILSON et al., 2002).

- Adesinas afimbriais - algumas bactérias possuem proteínas de superfície que são importantes para a adesão, mas que não formam a estrutura fimbrial, longa e polimérica. Essas adesinas são chamadas de adesinas afimbriais e geralmente promovem um contato mais forte entre a bactéria e a célula hospedeira que se segue à interação inicial via fímbria (SALYERS e WHITT, 2002; WILSON et al., 2002).

Algumas delas podem reconhecer proteínas na superfície da célula hospedeira em vez de carboidratos (SALYERS e WHITT, 2002). Muitas adesinas afimbriais reconhecem componentes da matriz extracelular como colágeno, laminina, elastina, proteoglicanos e hialuronos. Glicoproteínas adesivas como vitronectina, fibrinogênio e fibronectina, que podem estar presentes como moléculas secretadas ou associadas à membrana, são também reconhecidas por vários patógenos bacterianos (PIZARRO-CERDÁ e COSSART, 2006).

- Invasinas – algumas bactérias possuem adesinas chamadas de invasinas, que ativam a maquinaria do citoesqueleto da célula hospedeira permitindo a entrada bacteriana na célula através de fagocitose. Vantagens em invadir uma célula incluem proteção contra moléculas de defesa como anticorpos e complemento e uma fonte de nutrientes (KAISER, 2012).



#### 2.1.4 Camada S

Algumas bactérias possuem uma matriz monomolecular de subunidades proteínicas como componente mais externo do envelope celular, denominada de camada S, que em bactérias gram negativas, é ligada à membrana externa através do LPS. Ela protege a bactéria evitando a lise mediada por complemento, resiste ao efeito de proteases e pode formar ligações específicas com moléculas do hospedeiro (MESSNER et al., 2010).

#### 2.1.5 Cápsula

Mais externamente, algumas bactérias podem expressar cápsula. Esta cápsula é usualmente polissacarídica, pode ter espessura variável e estar firmemente ou não associada à superfície celular. O material capsular não associado à superfície é frequentemente chamado de *slime* (WINN et al., 2006). O papel da cápsula na virulência bacteriana é de proteger a bactéria da resposta imune do hospedeiro, como a ativação do complemento e morte mediada por fagocitose (SALYERS e WHITT, 2002). Além disso, cápsulas desempenham um papel na aderência de bactérias a células ou superfícies mucosas (WINN et al., 2006).

#### 2.1.6 Flagelo

O flagelo é primariamente uma organela que possibilita a motilidade e quimiotaxia bacterianas. É um apêndice filamentoso, longo, que tem origem na membrana interna e atravessa a parede celular bacteriana até o meio circundante. Os flagelos podem ser únicos ou múltiplos, polares ou peritríquios. Em bactérias

gram negativas, o flagelo é formado por três partes: corpo basal, embebido na membrana citoplasmática; o gancho que conecta o corpo basal ao filamento; e o filamento. Este é composto por fibrilas paralelas de subunidades proteicas denominadas flagelina e é a porção diretamente responsável pelo movimento (WINN et al., 2006; HAIKO e WESTERLUND-WIKSTRÖM, 2013). Em muitas espécies bacterianas o flagelo é reconhecido como um fator de virulência, sendo as estirpes não-flageladas menos virulentas, como observado em *Vibrio cholerae* e *Salmonella*. Portanto o flagelo desempenha um papel essencial na colonização facilitando a motilidade bacteriana em direção aos alvos no hospedeiro (HAIKO e WESTERLUND-WIKSTRÖM, 2013).

Entretanto, além da motilidade, o flagelo pode estar associado a outras funções relacionadas com virulência destacando-se adesão (KLINE et al., 2009; HAIKO e WESTERLUND-WIKSTRÖM, 2013), invasão e formação de biofilme (HAIKO e WESTERLUND-WIKSTRÖM, 2013).

#### 2.1.7 Sideróforos

Durante a infecção, o patógeno microbiano deve adquirir todo o ferro necessário para o seu metabolismo a partir do hospedeiro. No hospedeiro o ferro não está disponível livremente, e um mecanismo eficiente é utilizado pelas bactérias de forma a desviar íons metálicos para o metabolismo microbiano. Para obter esse suplemento de ferro, essencial para a virulência bacteriana, os microrganismos sintetizam e excretam ligantes de ferro, conhecidos como sideróforos. Estes são excretados no meio e então o complexo sideróforo-ferro é captado por um receptor específico na superfície bacteriana (SALYERS e WHITT, 2002; CHOPRA et al., 2009).

## 2.2 AEROMONAS spp.

### 2.2.1 Características gerais

*Aeromonas* spp. são bacilos gram negativos, oxidase positivos, anaeróbios facultativos que crescem rapidamente em meios de cultura utilizados na rotina laboratorial como ágar tripton de soja (MARTIN-CARNAHAN e JOSEPH, 2005).

Desde a criação do gênero *Aeromonas* em 1943 essas bactérias foram divididas em dois grupos, com base nas características bioquímicas e de crescimento. O grupo mesofílico consiste de espécies que tem crescimento ótimo em temperaturas de 35 a 37°C e estão associadas com uma variedade de infecções humanas. Seu principal representante é *A. hydrophila*. O segundo grupo, designado psicrófilico, compreende *A. salmonicida*, espécie que causa doença em peixes, é imóvel e possui temperatura ótima de crescimento entre 22 e 25°C (JANDA e DUFFEY, 1988)

Atualmente, existem 31 espécies de *Aeromonas* descritas (DSMZ, 2014), sendo de importância clínica humana *A. hydrophila*, *A. media*, *A. caviae*, *A. veronii* biovar sobria, *A. veronii* biovar veronii, *A. schubertii*, *A. jandaei*, *A. trota*, *A. bestiarum*, *A. popoffii*, *A. tecta*, *A. diversa*, *A. taiwanensis* e *A. sanarellii* (JANDA e ABBOTT, 2010; PARKER e SHAW, 2011).

Dentre as espécies isoladas de humanos, mais de 90% das estirpes produzem  $\beta$ -hemólise em ágar sangue de carneiro e são consideradas indol positivas, com exceção de *A. schubertii* (MARTIN-CARNAHAN e JOSEPH, 2005). A identificação de *Aeromonas* até o nível de espécie pode ser muito desafiadora. Poucos laboratórios clínicos são capazes de identificar espécies desse gênero além de complexo *A. hydrophila* ou complexo *A. caviae* (ABBOTT, CHEUNG e JANDA, 2003).

### 2.2.2 Habitat e transmissão

*Aeromonas* estão presentes em ambientes em que haja biosfera microbiana. Isto inclui ambientes aquáticos, solo, animais e alimentos. Este gênero é considerado quase sinônimo de água, sendo isolado de rios, lagos, mar, água potável, água subterrânea, água residual e esgoto em vários estágios de tratamento (JANDA e ABBOTT, 2010).

*Aeromonas* também foram encontradas no intestino de animais saudáveis como ovelhas, gado e cavalos em frequências que vão de 5 a 10% (CEYLAN et al., 2009).

Também já foram isoladas de vários alimentos, como carnes vermelhas, frango, peixe, laticínios e vegetais. Na maioria dos casos, os isolados de alimentos foram recuperados após técnicas de enriquecimento, indicando que a concentração da bactéria era relativamente baixa (PALUMBO et al., 1985).

Estas informações sugerem que *Aeromonas* podem ser transmitidas através do consumo de água e alimentos contaminados. KHAJANCHI et al. (2010) verificaram que estirpes de *Aeromonas* isoladas de amostras clínicas e de água possuíam os mesmos genes de virulência e os mesmos padrões de *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE), confirmando que a água é uma fonte de transmissão dessas bactérias.

### 2.2.3 Infecções causadas por *Aeromonas*

*Aeromonas* têm sido descritas como agentes causadores de uma variedade de infecções humanas, algumas das quais são citadas a seguir.

- Gastroenterite - é a doença mais frequentemente associada com essas bactérias (PARKER e SHAW, 2011). A diarreia causada por *Aeromonas* é um fenômeno mundial ocorrendo tanto em países industrializados quanto em desenvolvimento, pode afetar pessoas de todas as idades e atingir inclusive pessoas saudáveis (FIGUERAS, 2005). Mais de 85% das gastroenterites causadas por

*Aeromonas* estão associadas com as espécies *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii* biovar sobria (JANDA, 1991).

A gastroenterite por *Aeromonas* geralmente se manifesta de três formas principais: uma forma aguda e autolimitada de diarreia aquosa; disenteria com muco e sangue; e diarreia crônica (AGGER, MCCORMICK e GURWITH, 1985; JANDA e DUFFEY, 1988).

Em alguns casos a infecção pode se agravar levando à peritonite, colite e colangite (ALTWEGG e GEISS, 1989).

Raramente, pode ocorrer uma doença semelhante à cólera (JANDA e ABBOTT, 2010).

Infecções intestinais causadas por *Aeromonas*, incluindo gastroenterite, colite, peritonite e colangite podem evoluir para quadros extraintestinais que podem, em raras ocasiões, provocar meningite em indivíduos imunocomprometidos (PARRAS, DÍAZ e REINA, 1993; PARKER e SHAW, 2011).

- Infecção em feridas - O segundo tipo de infecção mais comum associado com *Aeromonas* é a infecção de feridas. Geralmente ocorre em indivíduos que sofreram ferimentos expostos à água ou ao solo contaminado, ambientes nos quais *Aeromonas* estão presentes (VOSS, RHODES e JOHNSON, 1992; WAKABONGO, 1995). As infecções de feridas causadas por *Aeromonas* são mais frequentes em pacientes que tiveram suas feridas expostas à água doce do que à água salgada (SEMEL e TRENHOLME, 1990) e estas podem se manifestar através de pústulas, úlceras ou abscessos (PARKER e SHAW, 2011). Raramente, *Aeromonas* também causam infecções em queimaduras, feridas cirúrgicas e mordidas de animais (KIENZLE, MULLER e PEGG, 2000; ANGEL et al., 2002; CHENG et al., 2004).

- Septicemia - A septicemia causada por *Aeromonas* pode ser classificada em quatro categorias, baseado na população afetada, fatores de risco, eventos que levaram à doença e modo de aquisição. A maioria (>80%) dos casos de septicemia causada por *Aeromonas* atinge pessoas que estão severamente imunocomprometidas, e são adquiridas na comunidade (JANDA e ABBOTT, 2010). Desordens mieloproliferativas e doenças crônicas hepáticas são fatores de risco (CHAN et al., 2000; DUTHIE et al., 1995; MENCACCI et al., 2003).

A septicemia por *Aeromonas* também foi associada à presença de ferimentos que resultaram em portas de entrada para o patógeno, como traumas resultantes de acidente automobilístico, picada de cobra, queimaduras por fogo e por eletricidade (CHIM e SONG, 2007; MONAGHAN et al., 2008; JANDA e ABBOTT, 2010).

Um pequeno, mas crescente grupo atingido por septicemia causada por *Aeromonas* inclui pessoas imunocompetentes, sem traumas ou fatores de risco para explicar a contaminação (ROBERTS et al., 2006; KAO et al., 2003). A última categoria de pessoas afetadas pela septicemia é bem peculiar e envolve pacientes de cirurgias plásticas ou reconstrutivas que fazem uso de sanguessugas medicinais (*Hirudo medicinalis*). Sanguessugas possuem *A. veronii* biovar sobria simbioticamente, o que pode causar uma infecção localizada no ser humano, raramente evoluindo para uma doença invasiva. Não foram relatados casos de morte associados a este grupo (JANDA e ABBOTT, 2010).

- Infecções do trato respiratório - *Aeromonas* também já foram isoladas de secreções respiratórias de pacientes hospitalizados, nos quais, se acreditava no passado, seriam apenas colonizadoras transitórias (JANDA e ABBOTT, 1998). A complicação respiratória mais frequentemente associada com *Aeromonas* é a pneumonia, que atinge primariamente pessoas que sofreram trauma e foram expostas à água contaminada. Atinge também pessoas que aparentemente não possuem nenhuma doença respiratória predisponente ou veículo de infecção definido (JANDA e ABBOTT, 2010).

- Infecções oculares - *Aeromonas* podem causar doenças oculares que vão desde endoftalmite até ceratite e ulceração córnea. Na maioria dos casos, não há trauma ou exposição ambiental que favoreça a infecção (JANDA e ABBOTT, 2010), e ao menos um caso de ceratite foi associado com o uso de lentes de contato gelatinosas (PINNA et al., 2004).

## 2.2.4 Fatores de virulência associados com *Aeromonas*

### 2.2.4.1 Toxinas

- Enterotoxinas - algumas estirpes de *Aeromonas* spp secretam uma enterotoxina denominada Act, que provoca degeneração das criptas e dos vilos do intestino delgado. Esta toxina também possui atividade hemolítica e citotóxica (TOMÁS, 2012). Ela se liga rapidamente aos eritrócitos a 37°C (1-5 min), cria poros de 1,14 – 2,8 nm e seu mecanismo de ação envolve a entrada de água através dos poros, resultando em intumescência celular e subsequente lise (FERGUSON et al., 1997). Act também leva à infiltração de macrófagos e células mononucleares no lúmen de alça ileal ligada de rato, indicando uma resposta inflamatória do hospedeiro. Além disso, Act induz a produção de citocinas pró-inflamatórias e ativa o metabolismo do ácido araquidônico em macrófagos murinos (CHOPRA et al., 2000).

Adicionalmente, foram identificados vários genes associados com apoptose que são estimulados em macrófagos tratados com Act. Estudos de microarranjo mostram a interação de Act com galectina-3 e SNAP-23, moléculas que parecem ser essenciais na apoptose induzida por Act em macrófagos murinos RAW 264.7 e células epiteliais intestinais HT-29 (GALINDO, GUTIERREZ e CHOPRA, 2006).

Além de Act, foram caracterizadas duas enterotoxinas citotônicas, que ao contrário de Act, não causam degeneração das criptas ou das vilosidades do intestino delgado. Uma dessas enterotoxinas, denominada Alt, é inativada a 56°C, enquanto a outra, chamada de Ast, é estável a mesma temperatura (CHOPRA e HOUSTON, 1989; SHA et al., 2002). Ambas provocam o alongamento de células de ovário de hamster chinês (CHO), causam secreção de fluidos em alças ileais ligadas de ratos e aumentam os níveis de AMPc e PGE<sub>2</sub> na mucosa intestinal (SHA et al., 2002; GALINDO et al., 2006). Tanto Alt quanto Ast representam novas moléculas com nenhuma homologia significativa a qualquer enterotoxina bacteriana conhecida (SHA et al., 2002).

- Hemolisinas - *Aeromonas* podem produzir e secretar hemolisinas, sendo a mais estudada uma proteína citolítica enterotóxica de 52 kDa chamada de aerolisina

(AerA). Essa proteína é sintetizada na célula como pré-pró-aerolisina. Ela possui uma sequência N-terminal de 25 aminoácidos que é removida assim que atravessa a membrana citoplasmática deixando a ainda inativa pró-aerolisina no periplasma. Uma vez secretada a pró-aerolisina é ativada pela clivagem de 25 aminoácidos da porção C-terminal. Tanto a pró-aerolisina quanto a aerolisina podem se ligar aos receptores glicoforina na membrana dos eritrócitos. No entanto, somente a aerolisina pode oligomerizar e formar canais na membrana dos eritrócitos, levando à lise celular (WILMSEN et al., 1990; PEMBERTON, KIDD e SCHIMDT, 1997). Em células renais de hamster (BHK), a pró-aerolisina causa a vacuolização do retículo endoplasmático (ABRAMI et al., 1998).

*Aeromonas* também podem produzir outras  $\beta$  hemolisinas (Aer, Hly<sub>a</sub>) e  $\alpha$  hemolisinas. As  $\alpha$  hemolisinas causam efeitos citotóxicos reversíveis e lise incompleta dos eritrócitos. As  $\beta$  hemolisinas são toxinas formadoras de poros que levam à lise osmótica e completa destruição dos eritrócitos (TOMÁS, 2012).

#### 2.2.4.2 Sistemas de secreção associados com virulência de *Aeromonas*

- Sistema de Secreção Tipo III (SST3) - observou-se que em *A. salmonicida*, AexT, um homólogo da exoenzima S (ExoS) de *Pseudomonas aeruginosa*, era um fator de virulência crucial para causar doença em peixes. Esta toxina causa efeitos citotóxicos em células de gônadas de truta. A proteína ExoS é secretada por um SST3 e a observação de que a secreção de AexT ocorria apenas após o contato de *A. salmonicida* com as células de peixe, levou à descoberta do SST3 em *Aeromonas* (BURR et al., 2002).

O papel do SST3 na virulência de *A. salmonicida* foi confirmado através de mutantes para vários genes do sistema de translocação (que possuem homologia com o SST3 de *Yersinia*) que aboliram o efeito citotóxico em células de peixe (BURR, STUBER e FREY, 2003). Em *A. hydrophila* isolada de peixe, 25 genes codificadores das proteínas que compõem o SST3 foram descritos (YU et al., 2004). Em *A. salmonicida*, os genes do SST3 estão presentes em um plasmídio, enquanto



em *Aeromonas* mesofílicas são de origem cromossomal (SHA et al., 2005). AexU, uma proteína efetora de *A. hydrophila* secretado via SST3, provoca a ADP-ribosilação de proteínas e a reorganização da actina resultando em arredondamento das células HeLa e morte celular via apoptose. Mutantes AexU<sup>-</sup> foram fagocitadas mais eficientemente por macrófagos murinos RAW 264.7 indicando a sua participação, e a do SST3, na virulência de *Aeromonas* (SHA et al., 2007; SIERRA et al., 2007).

- Sistema de Secreção Tipo VI (SST6) - a presença do SST6 no genoma da estirpe de *A. hydrophila* SSU, isolada de um paciente com diarreia, foi detectada através de sequenciamento de DNA. Vinte genes foram identificados e associados com a formação do SST6. Destes, 18 possuem alta identidade (>80%) com genes presentes em um *cluster* similar identificado em *A. hydrophila* ATCC 7966 (SUAREZ et al., 2008). Estudos sobre o SST6 em *A. hydrophila* SSU, mostraram que a proteína efetora VgrG1, translocada através do SST6, induziu citotoxicidade em células HeLa pela ADP-ribosilação da actina e subsequente apoptose mediada via caspase 9. A translocação de VgrG1 ocorreu mediante o contato da bactéria com a célula eucariótica, evidenciando a importância da adesão na efetividade do SST6, e a participação deste sistema de secreção na virulência de *Aeromonas* (SUAREZ et al., 2010).

#### 2.2.4.3 Adesinas

As adesinas podem ser classificadas como fimbriais ou *pili*, e afimbriais. Podem-se dividir os *pili* de *Aeromonas* em diferentes tipos morfológicos. O tipo de estrutura filamentosa expressa e o número delas em uma célula variam de acordo com a origem do isolado e com as condições de cultivo. Crescimento em baixas temperaturas e em meio líquido favorecem a expressão de *pili* na maioria das estirpes. Os dois grupos principais de *pili* encontrados em *Aeromonas* são: rígidos e curtos (S) e os longos e flexíveis (L). Ambos são observados em isolados clínicos e ambientais. Durante ensaio de adesão em células HEp-2, CARRELLO et al (1988) analisaram 34 *Aeromonas* isoladas de fezes diarreicas e 29 de água. Todos os

isolados de água apresentaram *pili* tipo S e não foram associados a um alto nível de adesão a células HEp-2. Todos os isolados fecais apresentaram *pili* tipo L, que foram associados a uma alta adesão à linhagem celular. Análises da estrutura dos *pili* tipo L revelam que se tratam de *pili* do tipo IV, um importante apêndice de ligação de várias bactérias gram negativas a células epiteliais (KIROV e SANDERSON, 1996), e que atuam também como hemaglutininas (BARNETT e KIROV, 1999). Em *Aeromonas* associadas com gastroenterite, já foram descritas duas famílias distintas de *pili* tipo IV: *bundle-forming pili* (Bfp) e *Aeromonas pili* tipo IV (Tap). Estes diferem na sequência de aminoácidos e na massa molecular da pilina (BARNETT et al., 1997). A remoção dos *pili* Bfp de 20 estirpes de *A. veronii* biovar sobria por tratamento mecânico ou tripsinização diminuiu a adesão a células intestinais Hep-2 e Caco-2 em torno de 80% (KIROV, HAYWARD e NERRIE, 1995). A adesão de *A. veronii* biovar sobria BC88 a células Hep-2, Henle 407 e tecido intestinal fresco e fixado de coelho foi bloqueada pelo pré-tratamento das células com *pili* Bfp purificado. O pré-tratamento da bactéria com soro anti-Bfp também inibiu a adesão. Os *pili* Bfp também promoveram a formação de ligações entre as bactérias (KIROV, O'DONOVAN e SANDERSON, 1999). Os *pili* Tap parecem não ser tão importantes quanto os Bfp durante a colonização intestinal de *Aeromonas*, pois sua inativação não alterou a adesão a células HEp-2 e Henle 407 (KIROV et al., 2000; CHOPRA et al., 2009).

Proteínas de membrana externa (Omp) também foram implicadas na adesão de *Aeromonas*. Em 1987 Atkinson e colaboradores correlacionaram a hemaglutinação provocada por uma estirpe de *A. hydrophila* com uma Omp de 43 kDa (FANG, GE e SIN, 2004). Uma Omp de 43 kDa também foi isolada de três estirpes de *A. caviae* que exibiam adesão agregativa a células HEp-2. A utilização de anticorpos produzidos contra essa Omp bloqueou a adesão das estirpes de *A. caviae* às células HEp-2 (ROCHA DE SOUZA et al., 2001) indicando a participação dessas proteínas na adesão. NAMBA et al. (2008) verificaram que OmpA de *A. veronii* é essencial para a adesão ao intestino de carpas (*Cyprinus carpio*), confirmando o papel de proteínas de membrana externa na adesão.

#### 2.2.4.4 Enzimas secretadas

*Aeromonas* produzem uma variedade de enzimas secretadas, como lipase e elastase, que provocam dano tissular, auxiliando na invasão e no estabelecimento da infecção, superando as defesas do hospedeiro e provendo nutrientes para a proliferação celular (PEMBERTON, KIDD e SCHIMDT, 1997).

#### 2.2.4.5 Camada S

Em 1978, UDEY e FRYER relatam que *A. salmonicida* com camada S são agregativas e exibem adesão a leucócitos humanos e de coelho e a células intestinais de peixe. Em 1992, DOIG, EMÖDY e TRUST relatam que a proteína da camada S de *A. salmonicida* é capaz de se ligar às glicoproteínas de matriz extracelular laminina e fibronectina. Camada S também foi descrita em *Aeromonas sobria* e *A. hydrophila*. Aquelas com presença de camada S mostraram-se mais virulentas em ensaio de inoculação intraperitoneal em ratos (ESTEVE et al., 2004; CHOPRA et al., 2009). Além disso, *Aeromonas* spp. com camada S pertencentes ao sorogrupo O:11 impediram a ativação do complemento (MERINO et al., 1996 a). Essas informações mostram a participação da camada S na virulência de *Aeromonas*.

#### 2.2.4.6 Cápsula

Alguns sorogrupos de *A. hydrophila* (O:11 e O:34) possuem polissacarídeo capsular (ZHANG, ARAKAWA e LEUNG, 2002). A presença de cápsula aumenta a capacidade de aderência e invasão de *A. hydrophila* em linhagens celulares de peixe (MERINO et al., 1997).

#### 2.2.4.7 Flagelo

O flagelo tem influência na adesão de *A. caviae* a células HEP-2. Foi demonstrado que a remoção do único flagelo polar por cisalhamento ou aglutinação com anticorpos antiflagelina reduziu significativamente a adesão bacteriana a células HEP-2. Além disso, vários mutantes que perderam o flagelo demonstraram uma dramática diminuição na sua adesão a várias linhagens celulares humanas (RABAAN et al., 2001). Embora apenas o flagelo polar seja expresso quando os micro-organismos crescem em meio líquido, algumas estirpes de *Aeromonas* também produzem flagelos laterais peritríquios quando cultivadas em meio semi-sólido (GAVÍN et al., 2002). Somente 50 a 60% das *Aeromonas* mesofílicas dentre as espécies mais comumente associadas com diarreia são capazes de expressar esse segundo tipo de flagelo, que é requerido para a motilidade do tipo *swarming* (KIROV et al., 2002).

A hiperflagelação coincide com o alto grau de aderência dessas bactérias quando comparado ao crescimento em caldo. Mutações pontuais nos genes que codificam estes flagelos reduziram em torno de 50% - 80% a aderência de *A. caviae* a células HEP-2 (KIROV et al., 2002). Além de estarem envolvidos com a motilidade do tipo *swarming*, os flagelos laterais também estão correlacionados com a produção de biofilme em um grande número de infecções bacterianas (KIROV et al., 2002). Estirpes de *A. hydrophila* com mutações em vários genes envolvidos na síntese de flagelos laterais estão prejudicadas na sua capacidade de formar biofilme (GAVÍN et al., 2002; KIROV et al., 2002). Além disso, a motilidade do tipo *swarming* está ligada à capacidade invasiva e pode estar relacionada a infecções persistentes e disenteria (KIROV, 2003). Em *Aeromonas* provenientes de material clínico, tanto o flagelo polar como o conjunto de flagelos laterais são considerados adesinas de enterócitos e precisam estar totalmente funcionais para uma boa formação de biofilme (KIROV, CASTRISIOS e SHAW, 2004).

#### 2.2.4.8 Lipopolissacarídio

O gênero *Aeromonas* é classificado em 96 sorogrupos (CHOPRA et al., 2009). FRANCKI e CHANG (1994) relatam que a adesão de uma estirpe de *A. sobria* à célula HEp-2 diminui em condições de cultivo que desfavoreceram a síntese do antígeno O, como crescimento prolongado até fase estacionária. O antígeno O:34 de uma estirpe de *A. hydrophila* mostrou ter um papel importante na adesão a células HEp-2. Mutantes para síntese do antígeno O apresentaram redução na adesão à células HEp-2 (MERINO et al., 1996 b), e mutantes de *A. hydrophila* O:34 desprovidas de antígeno O foram incapazes de colonizar o intestino de galinhas criadas livres de germes (MERINO et al., 1996 c).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar aspectos da adesão de estirpes de *Aeromonas* isoladas de amostras clínicas sobre linhagens celulares imortalizadas humanas.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar a ocorrência ou não de adesão das estirpes de *Aeromonas* sobre duas linhagens celulares em cultura.

Quantificar a adesão considerando número de células infectadas e bactérias aderidas.

Definir o padrão de adesão associado com as estirpes.

Verificar a produção de efeitos citotóxicos sobre as linhagens celulares.

Verificar a capacidade de hemaglutinação, e os possíveis mecanismos associados com esta atividade.

Verificar o envolvimento de fatores associados com adesão nas estirpes de *Aeromonas*.

Determinar a capacidade de adesão das estirpes sobre matriz extracelular.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 AMOSTRA

Para determinar a capacidade de adesão foram analisadas 40 estirpes de *Aeromonas* da bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia da UFPR previamente isoladas a partir de coproculturas (37 estirpes), infecção de ferida (1 estirpe), hemocultura (1 estirpe) e líquido (1 estirpe), além das estirpes padrão *A. hydrophila* ATCC 7966 e *A. caviae* ATCC 14486.

A identificação das bactérias foi realizada por meio de provas fenotípicas convencionais e confirmação por *Restriction fragment lenght polymorphism* (RFLP) do gene 16S rRNA (VIZZOTTO, 2009; ASSIS, 2012). As estirpes foram caracterizadas quanto a presença de genes associados com virulência, incluindo marcadores para o SST3 (*ascFG*, *ascV*), SST6 (*vasH*), enterotoxinas citotônicas termolábil e termoestável (*alt* e *ast* respectivamente), enterotoxina citotóxica (*act*), lipase e elastase (*lip* e *ela*, respectivamente) e hemolisinas (*aer*, *aerA*, *hlyA*) (WOLF, 2012).

As bactérias foram mantidas a temperatura ambiente em tubos com meio de manutenção composto por 5 g de ágar, 5 g de NaCl, 2,5 g de peptona bacteriológica (Oxoid L37), 2,5 g de peptona neutralizada (Oxoid L34) em 200 mL de tampão fosfato (contendo 2,8 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> em 134 mL de água destilada e 1,3 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> em 66 mL de água destilada) e 800 mL de água destilada (BURKE et al., 1984).

O QUADRO 1 mostra as informações referentes à presença dos genes de virulência nas estirpes estudadas.

# QUADRO 1 – CARACTERÍSTICAS DAS ESTIRPES DE *AEROMONAS* ESTUDADAS

Estirpes	Genes de virulência
AH 7966	<i>vasH, alt, ast, act, lip, ela, aer, aerA, hlyA</i>
AH 93C	<i>ascV, vasH, alt, ast, act, lip, ela, aer, aerA, hlyA</i>
AH F2 <sup>#</sup> , AH 297M	<i>ascV, vasH, alt, ast, lip, ela, hlyA</i>
AH 1	<i>vasH, ast, act, lip, ela, aerA, hlyA</i>
AH 44	<i>ascV, ast, lip, ela, hlyA</i>
AH 5LM	<i>ascV, alt, ast, lip, ela, hlyA</i>
AH 92C	<i>vasH, alt, lip, ela, aerA, hlyA</i>
AH 63	<i>ast, lip, ela, hlyA</i>
AVS 20, AVS 49H*, AC 73	<i>ascFG, ascV, act, aerA</i>
AVS 26	<i>ascFG, ascV, act</i>
AVS 312M	<i>ascV, act, ela, aerA</i>
AVS 55M	<i>vasH, alt, ast, act, lip, ela, aerA, hlyA</i>
AVS 70	<i>act, lip, ela, aerA</i>
AVS 35	<i>act, aerA</i>
AVS 39	<i>Act</i>
AVS 40, AC 43	<i>act, ela, aerA</i>
AT 2	<i>aerA</i>
AT 1999 <sup>§</sup>	<i>lip, aerA</i>
AC 6	<i>ast, lip, ela</i>
AC 19	<i>alt, lip, ela, hlyA</i>
AC 46	<i>act, lip, ela</i>
AC 50	<i>Lip</i>
AC 62	<i>ast, lip, ela, era</i>
AC 14486, AC 8LM, AC 359M, AC 423M	<i>vasH, lip, ela</i>
AC 14, AC 23, AC 67, AC 235M, AC 346M, AC 34LM, AC 248C, AC 252C	<i>lip, ela</i>
AH 49, AT 7, AC 22	nenhum dos genes pesquisados foi detectado

FONTE: Modificado de WOLF, 2012.

NOTA - AH: *A. hydrophila*; AT: *A. trota*; AVS: *A. veronii* biovar sobria; AC: *A. caviae*; *act*: gene codificador da enterotoxina citotóxica; *alt*: gene codificador da enterotoxina citotônica termolábil; *ast*: gene codificador da enterotoxina citotônica termoestável; *lip*: gene codificador de lipase; *ela*: gene codificador de elastase; *ascV* e *ascFG*: genes codificadores de marcadores para o sistema de secreção tipo três; *vasH*: gene codificador de marcador para o sistema de secreção tipo seis; *aer*, *aerA* e *hlyA*: genes codificadores de hemolisinas

<sup>#</sup>: isolado de ferida, \*isolado de hemocultura; <sup>§</sup>: isolado de líquido



As 42 estirpes de *Aeromonas* foram testadas quanto à capacidade de adesão (item 4.3.3), perfil de adesão (4.3.5) e citotoxicidade em células HeLa e HRT-18 (4.3.6).

Para os ensaios que visam detectar os possíveis fatores envolvidos na adesão (competição com carboidratos, tripsina, metaperiodato), capacidade de adesão em proteínas de matriz extracelular e hemaglutinação 8 estirpes representando as 4 espécies estudadas e sítios de isolamento foram selecionadas (itens 4.4 e 4.5).

## 4.2 LINHAGENS CELULARES UTILIZADAS NOS ENSAIOS

A capacidade de adesão, perfil de adesão e os efeitos citotóxicos das estirpes de *Aeromonas* foram determinados utilizando-se monocamadas da linhagem celular HeLa (célula epitelial de adenocarcinoma de cérvix – ATCC CCL-2) e da linhagem celular HRT-18 (célula epitelial de adenocarcinoma colorretal ileocecal – ATCC CCL-244). As células foram mantidas em frascos semiabertos em meio RPMI-1640 (Gibco), em estufa umidificada, com 5% de CO<sub>2</sub> e a 37°C, sendo repicadas a cada 3 dias.

## 4.3. ENSAIOS DE ADESÃO

### 4.3.1 Reativação das bactérias

Para reativação das bactérias estocadas, alíquotas do meio de manutenção foram plaqueadas em meio TSA e incubadas a 37°C durante 18-24 h. Após verificação da pureza da cultura, uma colônia de cada bactéria foi inoculada em 10 mL de caldo nutriente (Himedia, Mumbai, India) e, inicialmente, incubado em estufa estacionária por 16-18 h a 37°C (NISHIKAWA, KIMURA e KISHI, 1991; THORNLEY et al; 1996). Após este período as culturas foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 min, os sobrenadantes foram desprezados e os sedimentos lavados uma vez com

solução salina estéril 0,85%. O sedimento foi utilizado para preparar uma suspensão bacteriana em solução salina estéril 0,85% com turbidez equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland ( $\sim 10^8$  UFC/mL), o qual foi utilizado nos ensaios de adesão.

#### 4.3.2. Reativação e manutenção das linhagens celulares

Alíquotas da solução de congelamento (composta por 40% de meio de cultura RPMI-1640, 50% de soro fetal bovino e 10% de dimetilsulfóxido) contendo as células HRT-18 ou HeLa estocadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  foram transferidas para frascos de cultura com faces planas contendo meio de cultivo celular RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, estreptomicina 10 mg/L, penicilina 10.000 UI/L e mantidas sob atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  e temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  até atingir crescimento confluyente, quando as células foram tripsinizadas, contadas e repicadas para novos frascos. Somente após 1 semana (tempo necessário para as células se recuperarem do congelamento), o tapete celular foi removido com tripsina e as células foram contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas na concentração de  $2,5 \times 10^4$  células por poço em microplacas de 24 poços contendo lamínulas de vidro estéreis. As microplacas com as células foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  por 24 horas.

#### 4.3.3. Ensaios de adesão celular

Para a realização dos ensaios de adesão, as células foram lavadas três vezes com PBS (solução fosfato salina tamponada pH 7,4) estéril. Aos poços contendo as lamínulas com as células foram adicionados 400  $\mu\text{L}$  de HBSS (PACE et al., 1997), cuja composição está descrita no QUADRO 2 e 100  $\mu\text{L}$  ( $\sim 1,0 \times 10^7$  UFC) da suspensão bacteriana em salina (THORNLEY et al., 1996). Após 90 min de incubação a  $37^{\circ}\text{C}$ , as culturas foram lavadas quatro vezes com PBS estéril, por aspiração com pipeta Pasteur, e então fixadas com 2% de formol por 10 minutos e submetidas à coloração de MayGrünwald-Giemsa segundo SILVA, HASHIMOTO e

ALVES (2009). Após a coloração, as lamínulas passaram por processo de desidratação em acetona e xilol segundo ABUD (2005) e foram montadas em lâmina com bálsamo do Canadá sintético. Posteriormente foram analisadas em microscópio óptico Olympus EX-41 com sistema de captura de imagem acoplado (DP72) em aumento de 1000 vezes.

Para cada variável, uma lamínula foi deixada como controle negativo, e foi processada da mesma forma, mas inoculada apenas com salina em vez da suspensão bacteriana. Foi realizado um ensaio de adesão em triplicata para cada estirpe, ou seja, 3 lamínulas foram preparadas e analisadas para cada bactéria/linhagem celular.

#### QUADRO 2 – COMPOSIÇÃO DO PBS

Cloreto de sódio	8 g
Cloreto de potássio	0,2 g
Fosfato de sódio dibásico anidro	1,44 g
Fosfato de potássio monobásico anidro	0,24 g
Água q.s.p.	1000 mL    pH 7,4

FONTE: ROSKAMS e RODGERS, 2002

#### QUADRO 3 – COMPOSIÇÃO DO HBSS

Cloreto de cálcio anidro	0,14 g
Cloreto de potássio	0,4 g
Fosfato de potássio dibásico	0,06 g
Cloreto de magnésio hexahidratado	0,01 g
Sulfato de magnésio heptahidratado	0,01 g
Cloreto de sódio	8 g
Bicarbonato de sódio	0,35 g
Fosfato de sódio monobásico	0,09 g
Dextrose	1 0
Vermelho de fenol	0,001 g
Água q.s.p.	1000 mL    pH 7,4

FONTE: FRESHNEY, 2005

#### 4.3.4 Critérios para determinação da adesão bacteriana

Foi utilizado o critério proposto por KIROV, HAYWARD e NERRIE (1995). Primeiramente se determina o número de bactérias aderidas a 25 células randomicamente selecionadas e infectadas por lamínula. Então é calculada a média, valor que reflete o número de bactérias por célula infectada (BCI) em cada lamínula. O mesmo procedimento é adotado para cada uma das 3 lamínulas analisadas.

Em seguida foram observadas 100 células por lamínula e determinada a proporção de células infectadas com bactérias (PCI). O mesmo procedimento é adotado para cada uma das 3 lamínulas analisadas.

Então foi calculado o número de bactérias por célula (BC), o que foi obtido através da multiplicação do número de bactérias por célula infectada (BCI) pela proporção de células infectadas (PCI). Este cálculo é realizado individualmente para os resultados de cada uma das 3 lamínulas.

O número final de bactérias por célula do ensaio foi expresso como a média  $\pm$  desvio padrão da triplicata.

#### 4.3.5 Perfil de adesão

Como controles positivos para determinar o perfil de adesão foram utilizadas estirpes de *Escherichia coli* que apresentam os perfis de aderência localizada (EPEC E2348), agregativa (EAEC 2391) e difusa (DAEC C1845) em células HeLa. Para os ensaios com as estirpes de *E. coli*, as bactérias foram cultivadas *overnight* em caldo tripton de soja (Himedia), do qual utilizaram-se 40 uL como inóculo ( $3,0 \times 10^7$  UFC/mL). O meio RPMI, sem antimicrobianos, adicionado de 1% de D-manose (Sigma), foi utilizado para a realização do ensaio empregando um período de incubação de 3 h (SCALETSKY et al., 2002). O restante da metodologia foi conduzida sem alterações. Como controle negativo no ensaio foram adicionados 40 uL do caldo tripton de soja apenas.

#### 4.3.6 Avaliação da produção de efeitos citotóxicos

Foram considerados como efeitos citotóxicos modificações celulares incluindo desadesão celular, arredondamento, retração de citoplasma, *blebs* de membrana, presença de corpos apoptóticos, condensação nuclear, fragmentação nuclear e vacuolização (HENRY, HOLVILLE e MARTIN, 2013; MARTIN e HENRY, 2013)

#### 4.4 DETERMINAÇÃO DE FATORES ASSOCIADOS COM ADESÃO

Para esta etapa do estudo foram selecionadas oito estirpes, dentre elas AC 8LM, AVS 312M, isolados de fezes, e AT 1999, isolado de líquido, que tiveram seu genoma sequenciado; AVS 49H, isolado de hemocultura, AH F2, isolado de ferida, AT 2, AH 297M e AC 359M, isolados fecais, de modo a contemplar isolados representantes de todas as espécies e sítios anatômicos. Foram realizados 2 ensaios independentes, ambos em triplicata.

##### 4.4.1 Competição com carboidratos

Visa determinar se a presença de carboidratos interfere na adesão celular das estirpes analisadas. Os ensaios foram realizados de acordo com o descrito no item 4.3.3, mas no momento de adicionar o meio e a suspensão bacteriana aos poços contendo o cultivo celular, foi acrescentado 1% de D-manose (Sigma), D-galactose (Merck) ou L-fucose (Sigma), segundo NISHIKAWA et al. (1994).

##### 4.4.2 Tratamento com tripsina

O ensaio indica se a adesão das estirpes de *Aeromonas* sobre as células HeLa e HRT-18 envolve a participação de moléculas proteicas presentes na

superfície bacteriana. Foi utilizada a metodologia descrita por CARRELLO et al. (1998) e SUN et al. (2010) resumidamente, o sedimento bacteriano centrifugado e lavado (item 5.2.1) foi ressuspensão em PBS até a turvação de acordo com o tubo 3 da escala de McFarland ( $\sim 1,0 \times 10^9$  UFC/mL). Um mL desta suspensão foi tratado com 5 mL de uma solução contendo 1 mg/mL de tripsina (Worthington) em PBS. Em paralelo, o mesmo volume da suspensão bacteriana foi tratado somente com PBS (controle). Os dois tubos foram incubados por 30 min a 37°C. As suspensões bacterianas foram centrifugadas e a tripsina residual foi eliminada, e em seguida as bactérias foram lavadas duas vezes com PBS. As bactérias foram então ressuspensas em salina fisiológica estéril até a turbidez do tubo 0,5 da escala de McFarland ( $\sim 1,0 \times 10^8$  UFC/mL) e utilizadas nos ensaios de adesão conforme descrito no item 5.2.3. Para verificar se viabilidade bacteriana não foi afetada pelo tratamento enzimático, foram realizados cultivos de diluições seriadas das bactérias tratadas e não tratadas e o número de colônias determinado.

#### 4.4.3 Tratamento com metaperiodato de sódio

O tratamento das estirpes com o metaperiodato teve o objetivo de verificar o envolvimento de carboidratos na adesão sobre as células em cultura. Baseado em trabalho de THORNLEY et al. (1996), OKOCHI et al. (2005) e SUN et al. (2010), 1 mL das bactérias suspensas em salina com turvação de acordo com o tubo 3 da escala de McFarland ( $\sim 1,0 \times 10^9$  UFC/mL) foram tratadas com 5 mL de uma solução contendo 0,1 mM de metaperiodato de sódio em PBS por 30 min a temperatura ambiente, no escuro. Em seguida, as bactérias foram centrifugadas e o metaperiodato residual foi eliminado lavando-se as bactérias duas vezes com PBS. As bactérias foram então ressuspensas em salina fisiológica estéril até a turbidez similar ao tubo 0,5 da escala de McFarland, e utilizadas nos ensaios de adesão conforme o item 5.2.3. Para confirmar se viabilidade bacteriana não foi afetada pelo tratamento, foram realizados cultivos de diluições seriadas das bactérias tratadas e não tratadas.

#### 4.4.4 Ensaio de hemaglutinação

Foi utilizada a metodologia descrita por ATKINSON e TRUST (1980). Foram coletadas amostras de sangue total, sem anticoagulante, de cinco indivíduos do grupo O positivo. As amostras foram imediatamente acondicionadas na solução de Alsever 1:1 e mantidas a 4°C por no máximo 5 dias. Imediatamente antes do uso as células sanguíneas foram lavadas 3 vezes com PBS pH 7,4 e uma suspensão de 3% de células foi preparada neste mesmo tampão.

As bactérias foram cultivadas em caldo nutriente e em ágar TSA. As bactérias crescidas em ágar foram ressuspensas em PBS de acordo com a turbidez do tubo 3 da escala de McFarland ( $\sim 1,0 \times 10^9$  UFC/mL). As bactérias que cresceram em caldo, antes de ser ressuspensas, foram centrifugadas e lavadas 2 vezes com PBS. O ensaio de hemaglutinação foi realizado em placa de vidro, a temperatura ambiente, misturando-se 20 µL da suspensão sanguínea com 20 µL da suspensão bacteriana e homogeneizando a mistura através de movimentos circulares. O controle negativo utilizado foi PBS- suspensão sanguínea. A presença de aglutinação foi determinada visualmente. Experimentos cuja hemaglutinação não ocorreu após 10 min foram considerados como negativos para esta característica.

#### QUADRO 4 – COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO DE ALSEVER

Ácido cítrico monoidratado	0,55 g
Citrato de sódio diidratado	8 g
D-glucose	20,5 g
Cloreto de sódio	4,2 g
Água q.s.p.	1000 mL      pH 6,1

FONTE: ALSEVER e AINSLIE, 1941

#### 4.4.5 Inibição da hemaglutinação

Para as bactérias consideradas hemaglutinantes, foi realizado o ensaio de inibição da hemaglutinação utilizando a competição com carboidratos (ATKINSON e TRUST, 1980) e tratamento prévio das bactérias com tripsina (CARRELLO et al;

1988). Resumidamente: em placa de vidro, 20 µL da suspensão sanguínea foram misturados com 20 µL da solução de 1% de D-manose, D-galactose ou L-fucose em PBS mais 20 µL da suspensão bacteriana, ou com suspensões de bactérias tratadas com tripsina (item 4.4.2). As reações foram comparadas com o controle positivo (20 µL de bactéria, 20 µL de PBS, 20 µL de suspensão sanguínea) e controle negativo (40 µL de PBS e 20 µL de suspensão sanguínea).

#### 4.5 ADESÃO SOBRE MATRIZ EXTRACELULAR

Para determinar a adesão bacteriana à matriz extracelular, as 8 estirpes bacterianas foram adicionadas, individualmente, sobre placa previamente incubada com 50 µg/mL de Matrigel. Esse composto, rico em colágeno IV e laminina, foi purificado a partir do tumor de Engelbreth–Holm–Swarm de acordo com o procedimento de PAULSSON et al (1987) e KLEINMAN et al (1986), no Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos do Departamento de Biologia Celular da UFPR e gentilmente cedido pelo professor Silvio Sanches Veiga.

As bactérias foram cultivadas em caldo nutriente conforme o item 4.3.1 e ressuspensas em PBS até atingirem turvação semelhante ao tubo 3 da escala de McFarland ( $\sim 1,0 \times 10^9$  UFC/mL).

Baseado nas metodologias propostas por STYRIAK e LJUNGH (2003) e ZULFAKAR et al (2012), uma placa de cultura de células de 96 poços (TPP, Suíça) com 200 µL por poço de Matrigel 50 µg/mL em PBS foi incubada *overnight* a 4°C. Os poços foram lavados 3 vezes com PBS e bloqueados com a adição de 400 µL de albumina sérica bovina 50 µg/mL (Amresco) por 2 h a temperatura ambiente. Somente albumina foi adicionada a 4 poços (branco da albumina). Os poços foram lavados 2 vezes com PBS. Foram acrescentados 200 µL da suspensão bacteriana a 4 poços com Matrigel e albumina, e a 4 poços com albumina somente e incubado a 37°C por 1 h. Como controle o mesmo procedimento foi realizado com a adição de 200 µL de PBS a 4 poços (branco do diluente). Para retirar as bactérias não aderidas, os poços foram lavados 3 vezes com PBS. Então o processo de fixação foi continuado colocando a placa em estufa a 55°C por 20 min. Para corar as bactérias, foram adicionados aos poços 200 µL de cristal violeta 1% filtrado e mantido em contato por 45 min. Os poços foram lavados 6 vezes com água destilada estéril para



retirar excesso do corante. Após a placa secar a temperatura ambiente, o corante adsorvido no poço foi eluído com 250 µL de álcool:acetona 1:1 e após 30 min a absorbância da coloração resultante foi lida em 570 nm em fotômetro de microplacas ThermoScientific Multiscan FC (STYRIAK e LJUNGH, 2003). O ensaio foi realizado uma vez em quadruplicata.

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados do efeito dos meios de cultivo e manutenção celular no número de bactérias aderidas em células HRT-18 foram comparados utilizando análise de variância (ANOVA one way) com pós-teste de Tukey e probabilidade menor que 0,05 foi considerada estatisticamente significativa. Os dados da caracterização da adesão de estirpes de *Aeromonas* segundo índice BC foram analisados segundo teste do chi-quadrado e probabilidade menor que 0,05 foi considerada estatisticamente significativa.

Os dados dos testes de competição com carboidratos foram comparados utilizando análise de variância (ANOVA one way) com pós-teste de Tukey e probabilidade menor que 0,001 foi considerada estatisticamente significativa. Os dados dos testes de inibição da adesão por tripsina e metaperiodato e adesão à matriz extracelular foram comparados segundo teste T não-pareado e probabilidade menor que 0,001 foi considerada estatisticamente significativa. Para todas as análises o *software* utilizado foi o GraphPadPrism versão 5.0.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 ENSAIOS DE ADESÃO

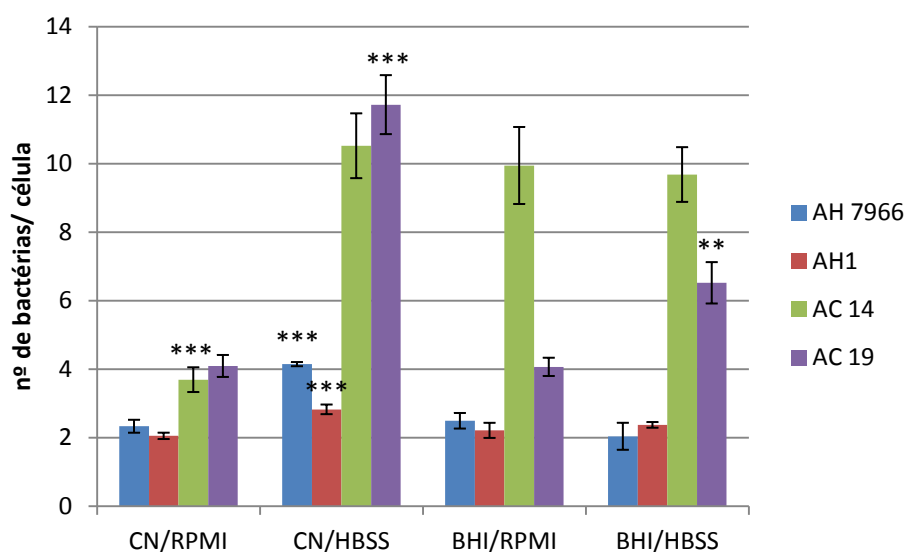
A colonização do hospedeiro por micro-organismos é um processo complexo. A maioria das bactérias que colonizam eucariotos devem se ligar diretamente às células do hospedeiro para estabelecer um nicho de replicação (ISBERG e BARNES, 2002). Os estudos sobre adesão de *Aeromonas* datam de 1988 quando CARRELLO et al. (1988) mostraram que isolados fecais e de água de *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria* eram capazes de aderir em células HEp-2. Considerando que a adesão é um fator essencial na interação patógeno-hospedeiro, o objetivo deste trabalho foi caracterizar estirpes de *Aeromonas* incluindo as espécies *A. hydrophila*, *A. veronii* sobria, *A. caviae* e *A. trota* quanto à capacidade de adesão em células HeLa e HRT-18.

Primeiramente foram definidas as condições para a realização dos ensaios. Algumas *Aeromonas* mesofílicas quando crescem em caldo na presença de 0,5% de glucose, num período de 18 horas, levam ao acúmulo acetato, o que as torna inviáveis, um fenômeno denominado “efeito suicida” (NAMDARI e BOTTONE, 1988). Por essa razão foi avaliado o efeito do caldo nutriente, que não contém glucose na sua composição, como meio de cultura para o crescimento bacteriano nos ensaios de adesão, além do meio “Brain Heart Infusion” (BHI) este frequentemente utilizado em estudos similares (NEVES, NUNES e MILHOMEN, 1994; THORNLEY et al., 1996) e que possui em sua composição 2 g/L de glucose. Como sistema para manutenção das linhagens celulares durante os ensaios de adesão além do meio RPMI, também foi estudado o efeito do meio HBSS visando reduzir o número de possíveis interferentes no ensaio de adesão uma vez que este tem um número menor de componentes. Os estudos para padronização das condições de ensaio foram realizados utilizando apenas células da linhagem HRT-18 e 4 estirpes de *Aeromonas*: *A. hydrophila* ATCC 7966 e AH1, e *A. caviae* AC14 e AC19.

Os ensaios foram inicialmente realizados com tempo de contato bactéria-célula de 90 minutos que é descrito por vários autores (GREY e KIROV, 1993; NEVES, NUNES e MILHOMEN, 1994; KIROV, HAYWARD e NERRIE, 1995; COUTO et al., 2007). No entanto foi observado, para as estirpes AH 7966 e AH1 um

intenso efeito citotóxico levando ao desprendimento de muitas células da lamínula, inviabilizando a contagem. Dessa forma, o tempo de ensaio foi reduzido para 75 min e adotado para todos os experimentos subsequentes. Os resultados estão representados no GRÁFICO 1.

GRÁFICO 1 – EFEITO DOS MEIOS DE CULTIVO E MANUTENÇÃO CELULAR NO NÚMERO DE BACTÉRIAS ADERIDAS EM CÉLULAS HRT- 18



NOTA - AH: *A. hydrophila*; AC: *A. caviae*. As bactérias foram cultivadas em caldo nutriente (CN) e em caldo *brain heart infusion* (BHI), por 16 horas a 36°C e tratadas como descrito no item 4.3.1. As células HRT-18 foram tratadas como descrito no item 4.3.2 e mantidas em meio *Roswell Park Memorial Institut* (RPMI) e solução salina balanceada de Hank (HBSS) durante os ensaios de adesão. Foi realizado um ensaio em triplicata. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

As estirpes de *A. caviae* (AC 14, AC 19) apresentaram maior número de células aderentes que as de *A. hydrophila* (AH 7966, AH 1) nas 4 condições analisadas (GRÁFICO 1). Os asteriscos indicam que as estirpes AH 7966, AH 1 e AC 19 apresentaram adesão significativamente maior nas condições caldo nutriente e HBSS, enquanto a estirpe AC 14 apresentou adesão significativamente menor na condição caldo nutriente e RPMI, sendo indiferente nas demais condições.

Com base nos resultados acima, o meio escolhido para o cultivo bacteriano foi o caldo nutriente, e para a manutenção das células durante o ensaio de adesão o

meio HBSS, pois foi a condição em que a taxa de adesão foi significativamente maior para todas as estirpes. O tempo de incubação bactéria-célula foi de 75 min, inferior ao utilizado na maioria dos estudos.

#### 5.1.1 Ensaio de adesão de *Aeromonas* em células HeLa e HRT-18

Os ensaios de adesão foram realizados utilizando células das linhagens HeLa (ATCC – CCL-2, adenocarcinoma cervical humano) e HRT-18 (ATCC – CCL-244, adenocarcinoma colorretal ileocecal humano). A morfologia típica dessas células é mostrada na FIGURA 1.

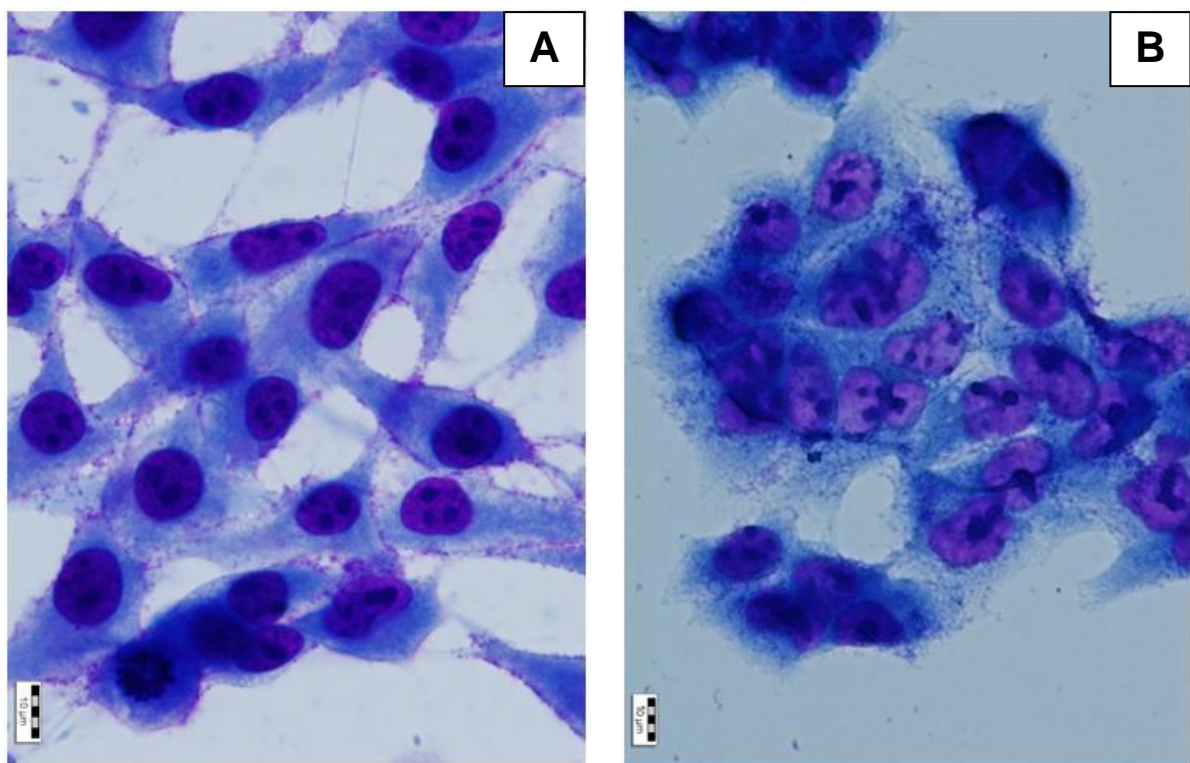


FIGURA 1 - MORFOLOGIA TÍPICA DAS LINHAGENS CELULARES HELA E HRT-18 EM CULTURA.

NOTA - As células foram cultivadas como descrito no item 4.3.3 (controle negativo). A - representa as células HeLa, B - células HRT-18.

FONTE: O autor (2014)

As linhagens celulares já utilizadas para ensaios de adesão em *Aeromonas* incluem HEp-2 (CARRELLO et al., 1988; GREY e KIROV, 1993; NEVES, NUNES e MILHOMEN, 1994; OTTAVIANI et al., 2011; SAIDI et al., 2011), Caco-2 (KIROV, HAYWARD e NERRIE, 1995; GUIMARÃES et al., 2002; SAIDI et al., 2011; BERTUCCIO, PICERNO e SCOGLIO, 2012), células adrenais de camundongo Y1 (CLARK et al., 1989), HeLa, (PAL et al., 1992; BAUAB, FERNANDES e FALCÃO, 2001 e BHOWMIK et al., 2009) e HT-19 (COUTO et al., 2007). Não foram encontrados estudos de adesão de *Aeromonas* realizados com células da linhagem HRT-18.

A FIGURA 2 mostra a presença de bactérias aderidas às células HeLa e HRT-18.

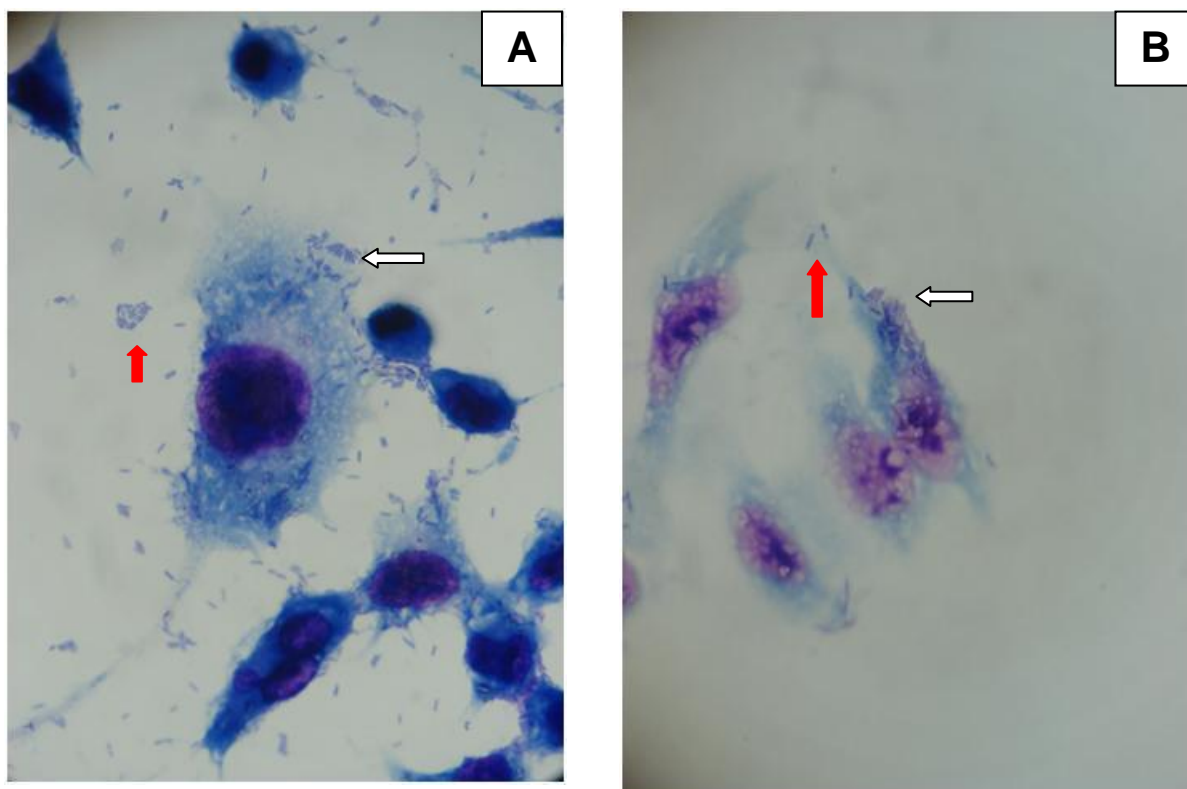


FIGURA 2 - ADESÃO DE *AEROMONAS* EM CULTURAS DE CÉLULAS HELA (A) E HRT-18 (B)

NOTA - as setas brancas indicam bactérias aderidas à célula; as setas vermelhas indicam bactérias aderidas à lamínula.

FONTE: O autor (2014)

Segundo a FIGURA 2, pode-se observar que as bactérias aderem às células e à lamínula, o que foi observado em outros estudos (NEVES, NUNES e MILHOMEN, 1994; COUTO et al., 2007) e difere dos resultados de GREY e KIROV (1993), que relatam que as estirpes aderentes mostraram ligação clara ao citoplasma da célula HEp-2 e nenhuma ligação ao fundo da lamínula.

Os resultados dos ensaios de adesão de *Aeromonas* sobre as linhagens celulares estão indicados na TABELA 1.

TABELA 1 - ADESÃO DE *AEROMONAS* EM LINHAGENS CELULARES (CONTINUA)

Estirpes	Linhagens					
	HeLa			HRT-18		
	BCI	PCI (%)	BC	BCI	PCI (%)	BC
AH 7966	3,7	94	3,5 ± 0,7	3,5	83	2,9 ± 0,3
AH 93C	4,4	96	4,2 ± 0,5	5,2	92	4,8 ± 1,5
AH F2	5,9	76	4,5 ± 1,1	4,7	70	3,3 ± 1,1
AH 297M	7,3	93	6,8 ± 1,9	8,0	82	6,6 ± 1,3
AH 1	2,9	91	2,6 ± 0,2	3,4	87	3,0 ± 0,7
AH 44		ND		11,0	96	10,6 ± 1,6
AH 5LM		ND		6,1	82	5,0 ± 0,1
AH 92C	6,0	99	5,9 ± 0,2	5,5	96	5,3 ± 0,8
AH 63	3,3	94	3,1 ± 0,4	5,1	95	4,8 ± 1,1
AVS 20	4,1	96	3,9 ± 0,7	5,6	91	5,1 ± 0,8
AVS 49H	7,6	94	7,2 ± 2,9	8,3	91	7,6 ± 0,6
AC 73	3,1	77	2,4 ± 0,8	4,8	93	4,5 ± 1,3
AVS 26	13,4	99	13,2 ± 4,1	8,2	95	7,7 ± 1,8
AVS 312M	9,0	90	8,2 ± 1,4	8,8	80	7,0 ± 0,7
AVS 55M	9,9	94	9,4 ± 1,5	7,9	91	7,2 ± 1,0
AVS 70	7,3	93	6,8 ± 1,5	6,2	90	5,5 ± 0,8
AVS 35	3,5	52	1,8 ± 0,1	2,6	48	1,3 ± 0,2
AVS 39	9,0	96	8,6 ± 0,8	5,6	91	5,1 ± 0,9
AVS 40		ND		8,9	93	8,3 ± 1,3
AC 43		ND		6,8	83	5,6 ± 0,6
AT 2	6,6	99	6,5 ± 0,4	9,9	89	8,8 ± 0,5

TABELA 1 - ADESÃO DE *AEROMONAS* EM LINHAGENS CELULARES (CONCLUSÃO)

Estirpes	Linhagens					
	HeLa			HRT-18		
	BCI	PCI (%)	BC	BCI	PCI (%)	BC
AT 1999	11,3	97	11 ± 3,2	13	67	8,7 ± 2,4
AC 6	7,0	98	6,8 ± 0,5	10,6	96	10,2 ± 0,4
AC 19	6,3	96	6,0 ± 0,2	13,9	99	13,7 ± 1,5
AC 46	10,5	97	10,2 ± 0,6	19,7	98	19,3 ± 4,0
AC 50	3,4	87	2,9 ± 0,2	4,7	77	3,7 ± 1,1
AC 62	1,4	4	0,1 ± 0,0	1,9	8	0,1 ± 0,0
AC 14486	7,1	95	6,8 ± 1,1	8,9	93	8,3 ± 1,2
AC 8LM	9,3	93	8,7 ± 2,4	10,1	87	8,8 ± 6,2
AC 359M	12,2	98	12 ± 4,6	15,3	98	15 ± 8,6
AC 423M	1,7	10	0,2 ± 0,0	1,7	5	0,1 ± 0,0
AC 14	4,5	92	4,1 ± 0,1	10,9	87	9,6 ± 0,8
AC 23	2,0	55	1,1 ± 0,6	1,8	50	0,9 ± 0,2
AC 67	4,5	93	4,2 ± 1,2	7,0	90	6,3 ± 0,9
AC 235M	3,0	71	2,1 ± 0,1	2,9	62	1,8 ± 0,4
AC 346M	5,6	92	5,2 ± 0,6	8,6	93	8,0 ± 1,4
AC 34LM	2,1	48	1,0 ± 0,15	3,4	45	1,5 ± 0,36
AC 248C	1,5	11	0,2 ± 0,0	1,6	6	0,1 ± 0,0
AC 252C	14,6	96	13,9 ± 0,4	20,9	90	18,8 ± 4,3
AH 49	1,4	2	0,03 ± 0,0	0,8	1	0,01 ± 0,0
AT 7	3,8	90	3,5 ± 2,2	7,9	93	7,4 ± 0,3
AC 22	3,7	91	3,4 ± 0,5	5,9	94	5,6 ± 0,4

NOTA - AH: *A. hydrophila*; AT: *A. trota*; AVS: *A. veronii* biovar sobria; AC: *A. caviae*. Resultados referentes a um ensaio realizado em triplicata. BCI: média de bactérias por célula infectada, PCI: média da proporção de células infectadas, BC: média ± desvio padrão de bactérias por célula; ND – não determinado devido ao efeito citotóxico que causou desadesão total das células.

Estes dados mostram que as estirpes de *Aeromonas* estudadas são capazes de aderir tanto às células HeLa quanto HRT-18, mas variam em relação à capacidade de adesão, como discutido a seguir. Em células HeLa quatro estirpes

(AH 44, AH 5LM, AVS 40 e AC 43) não puderam ser analisadas quanto à adesão devido ao afeito citotóxico que causou desadesão celular total. No entanto para as células HRT-18 esse efeito não ocorreu, e foi observada adesão para todas as estirpes. Outros estudos realizados com *Aeromonas* também relatam efeitos citotóxicos levando à desadesão das células HEp-2 da lamínula (CARRELLO et al., 1988), e efeitos severos que requereram modificações nos ensaios (GREY e KIROV, 1993), como ocorreu no presente estudo no qual o tempo de incubação bactéria – célula foi reduzido para 75 min.

Em células o HeLa número de bactérias aderidas/célula (BCI) variou de 1,4 (estirpes AH 49 e AC 62) a 14,6 (estirpe AC 252C), enquanto a porcentagem de células infectadas (PCI) foi de 2 (estirpe AH 49) a 99% (estirpes AH 92C, AVS 26 e AT 2). Em HRT-18 a variação do BCI foi 0,8 a 20,9 para as estirpes AH 49 e AC 252C, respectivamente. A porcentagem de células infectadas variou de 1 (estirpe AH 49) a 99% (AC 19).

O índice BC, que leva em consideração tanto o número de bactérias aderidas/célula quanto a porcentagem de células infectadas (GREY e KIROV, 1993), variou de 0,03 (estirpe AH 49) a 13,9 (estirpe AC 252C) em HeLa, e em HRT-18 de 0,01 (estirpe AH 49) a 19,3 (estirpe AC 46).

No geral os resultados dos ensaios de adesão foram similares em ambas as linhagens (TABELAS 1 e 2). Resultados relatados por KIROV, HAYWARD e NERRIE (1995) que realizaram ensaios de adesão de *Aeromonas* biovar sobria em células HEp-2 e Caco-2 mostram que a adesão bacteriana foi independente da linhagem celular utilizada. O mesmo foi observado por THORNLEY et al (1996) que realizaram ensaios de adesão em isolados clínicos de *Aeromonas caviae* em células HEp-2 e Caco-2. Embora seja possível que as bactérias se liguem a diferentes receptores sobre as duas linhagens celulares, isto parece improvável devido aos valores similares de adesão obtidos para uma variedade de diferentes estirpes bacterianas KIROV, HAYWARD e NERRIE (1995), o que parece ser o caso como indicam os dados representados nas TABELAS 1 e 2.

Não há um critério adotado universalmente para quantificar a adesão bacteriana. CRAVIOTO e colaboradores (1979) pioneiros nos estudos de adesão em



*Escherichia coli* consideraram apenas o número de células infectadas. Foram consideradas como positivas para essa característica as estirpes que aderiram no mínimo a 40% das células HEp-2, e como não-aderentes aquelas ligadas a menos de 10% das células. Resultados intermediários não foram encontrados (CRAVIOTO et al., 1979). Segundo esse critério, no presente estudo 4 estirpes seriam não-aderentes (AC 62, AC 423M, AC 248C e AH 49), estas apresentam valor de BC entre 0,01 a 0,2 em ambas as linhagens.

Ainda são poucos os estudos de adesão com *Aeromonas* (CARRELLO et al., 1988; CLARK et al., 1989; GREY e KIROV, 1993; NEVES, NUNES e MILHOMEM, 1994; KIROV, HAYWARD e NERRIE, 1995; SAIDI et al., 2011; OTTAVIANI et al., 2011) e frequentemente condições de ensaio distintas são utilizadas incluindo meios de cultura, tempo e temperatura de incubação, concentração do inóculo, linhagens celulares e tempo de incubação bactéria-célula. Além da variação nas condições de ensaio, também são utilizados critérios distintos para quantificar a adesão, e alguns autores não informam os critérios utilizados.

CARRELLO et al. (1988), pioneiros nos ensaios de adesão com *Aeromonas*, avaliaram o comportamento de estirpes de *Aeromonas* spp (34 de fezes diarreicas e 29 de água) em células HEp-2. As bactérias foram cultivadas em meio “heart infusion broth” até fase log e o ensaio foi realizado com inóculo de  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL e tempo de incubação de 90 min, a 37°C. Utilizou o índice BC, e o critério empregado foi o seguinte: estirpes que apresentaram menos de 10 bactérias/células foram consideradas como pouco aderentes, e altamente aderentes as estirpes com 10 ou mais bactérias/célula.

CLARK et al (1989) realizaram ensaio de adesão com 11 isolados clínicos de *Aeromonas* spp. em células adrenais de camundongo Y1. As bactérias foram cultivadas em ágar sangue de carneiro por 18 h e o ensaio foi realizado com inóculo de  $1,0 \times 10^7$  UFC/mL e tempo de incubação de 30 min. Com inóculo maior ou incubação prolongada ocorria a destruição das células adrenais. Os autores examinaram 100 células, considerando aquelas com 3 ou mais bactérias aderidas. O critério utilizado para quantificar a adesão foi: 90% ou mais de células infectadas –

aderentes; entre 11 e 89%, adesão moderada; e discreta quando a porcentagem de células infectadas era 10% ou menos.

NISHIKAWA, KIMURA e KISHI (1991) realizaram ensaio de adesão com 273 isolados de *Aeromonas* spp. incluindo isolados de fezes, alimentos e ambiente, utilizando células INT 407. As bactérias foram cultivadas em caldo nutriente por 18 h e o ensaio foi realizado com inóculo de  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL e tempo de incubação de 3 h. Estes autores consideraram aderentes estirpes com até 20 bactérias/célula infectada e muito aderentes estirpes com mais de 20 bactérias/célula infectada.

GREY e KIROV (1993) realizaram ensaio de adesão com 60 isolados de *Aeromonas* spp. de origem clínica (80% de fezes diarreicas), água e alimentos em células HEp-2. As bactérias cresceram em ágar BHI por 20-24 h e o ensaio foi realizado com inóculo de  $5,0 \times 10^5$  UFC/mL e tempo de incubação de 90 min. O índice BC foi utilizado por esses autores para a quantificação e consideraram que bactérias com índices de zero a 1 eram “não-adesivas”, de 1 a 10 pouco aderentes, entre 10 a 20 aderentes e acima de 20 altamente aderentes.

OTTAVIANI et al (2011) realizaram ensaio de adesão com 142 isolados de *Aeromonas* spp. (32 de fezes, 81 de alimentos e 21 de água) em células HEp-2. As bactérias cresceram em TSB sem glucose até alcançar absorbância de 0,07 em 600 nm a 37°C e o ensaio foi realizado com inóculo de  $5,0 \times 10^6$  UFC/mL e tempo de incubação de 90 min. Para determinar a adesão foram observadas ao menos 50 células contendo bactérias aderentes e o número médio de bactérias por célula calculado. A adesão foi considerada como positiva quando esse valor foi maior que 10.

Portanto, pode-se perceber que as condições de ensaio e critérios para quantificar a adesão diferem entre os estudos, o que dificulta fazer comparações. Enquanto alguns estudos valorizam o número de células infectadas outros empregam o número de bactérias/célula infectada. Alguns como CARRELLO et al. (1988) e GREY e KIROV (1993) utilizaram ambas as informações e estabeleceram o índice BC, que foi utilizado neste trabalho.

A TABELA 2 mostra a classificação das estirpes de *Aeromonas* analisadas no presente trabalho de acordo com os critérios de GREY e KIROV (1993).

TABELA 2 – CARACTERIZAÇÃO DA ADESÃO DE ESTIRPES DE *AEROMONAS* SEGUNDO O ÍNDICE BC

BC	Linhagens celulares	
Níveis de adesão	HeLa	HRT-18
0 - 1	5	5
> 1 - 5	15	11
> 5 - 10	13	20
> 10	5	7

NOTA - BC: número de bactérias/célula. A esta tabela de contingência foi aplicado o teste de chi-quadrado e obtido  $p=0,5453$

A TABELA 2 mostra que a distribuição das estirpes de *Aeromonas* de acordo com o nível de adesão não difere entre as linhagens HeLa e HRT-18 ( $p=0,5453$ ).

De acordo com CARRELLO et al. (1988) todas seriam aderentes. Entretanto de acordo com critério estabelecido por CARRELLO et al. (1988) e GREY e KIROV (1993) a maioria das estirpes analisadas no presente trabalho apresenta baixo nível de adesão ( $BC < 10$ ).

Entretanto as condições de teste dos 3 estudos foram distintas em relação às condições de cultivo, inóculo e condições de incubação bactéria/células, incluindo o tempo de contato, que foi reduzido no presente trabalho para 75 min. Segundo CLARK et al., (1989) o número de células infectadas varia com o inóculo e o tempo de contato bactéria/célula, o que pode ter contribuído para a baixa adesão observada na maioria das estirpes aqui analisadas.

### 5.1.2 Perfil de adesão

Para estabelecer o perfil de adesão das estirpes de *Aeromonas* foram utilizados como referência os perfis descritos para *Escherichia coli* em células HeLa. Dois perfis de adesão foram inicialmente identificados por SCALETSKY et al. (1984), em um deles a bactéria é observada ao redor ou cobrindo toda a superfície da célula, e é denominado aderência difusa. No segundo a ligação é limitada a um ou poucos sítios da superfície celular formando microcolônias, característica da aderência localizada.

O padrão de adesão agregativo foi descrito por NATARO e colaboradores em 1987 (citado por PIAZZA et al., 2010) e deriva da habilidade que estas bactérias apresentam de se ligar umas às outras, às células epiteliais e à superfície das placas de cultura formando estruturas descritas como “stacked-brick” ou tijolos empilhados.

Os ensaios com *E. coli* foram realizados apenas em células HeLa. As FIGURAS 3 a 5 mostram os padrões de adesão obtidos com as estirpes de *E. coli* empregadas como referência.

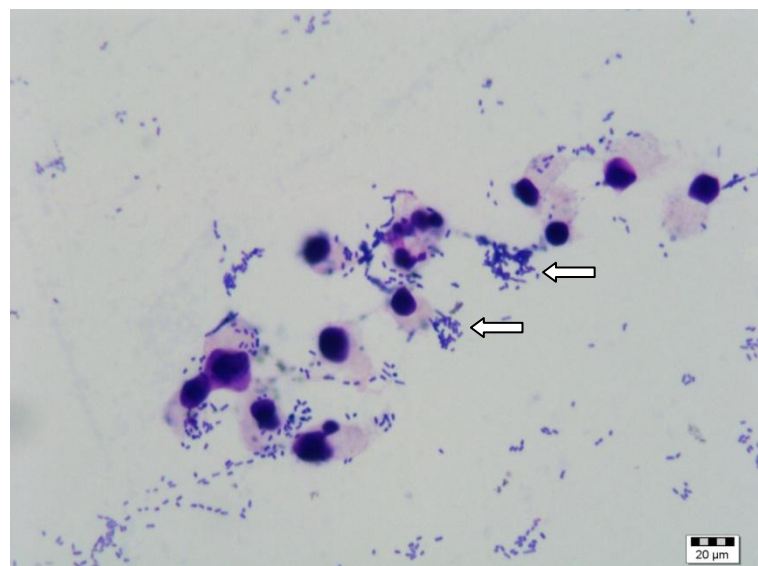


FIGURA 3 – ADESÃO DO TIPO AGREGATIVA DE EAEC 2391

NOTA - as células HeLa aparecem com o citoplasma corado em rosa e o núcleo em roxo. As setas destacam grupamentos de bactérias com padrão de adesão agregativa.

FONTE: O autor (2014)

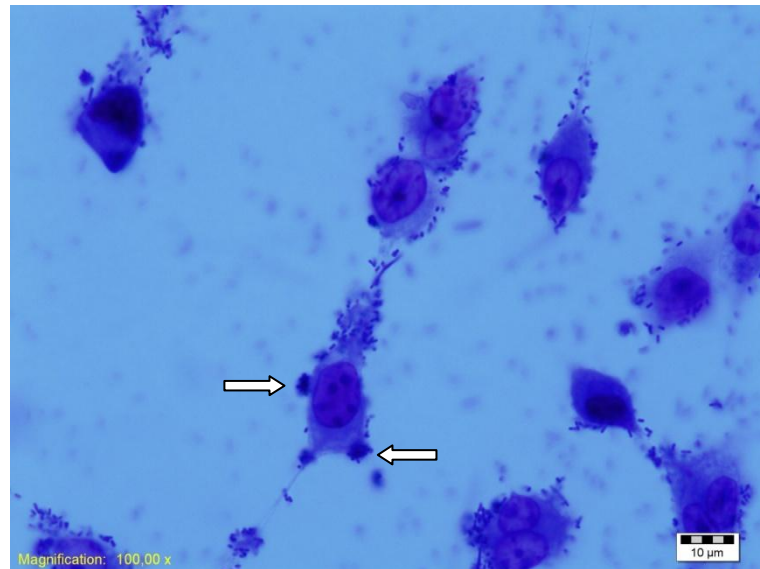


FIGURA 4 – ADESÃO DO TIPO LOCALIZADA DE EPEC E2348

NOTA - as células HeLa estão com o citoplasma corado em azul e o núcleo em roxo. As células bacterianas aparecem como estruturas menores coradas em azul. As setas indicam agrupamentos de bactérias com padrão típico de adesão localizada.

FONTE: O autor (2014)

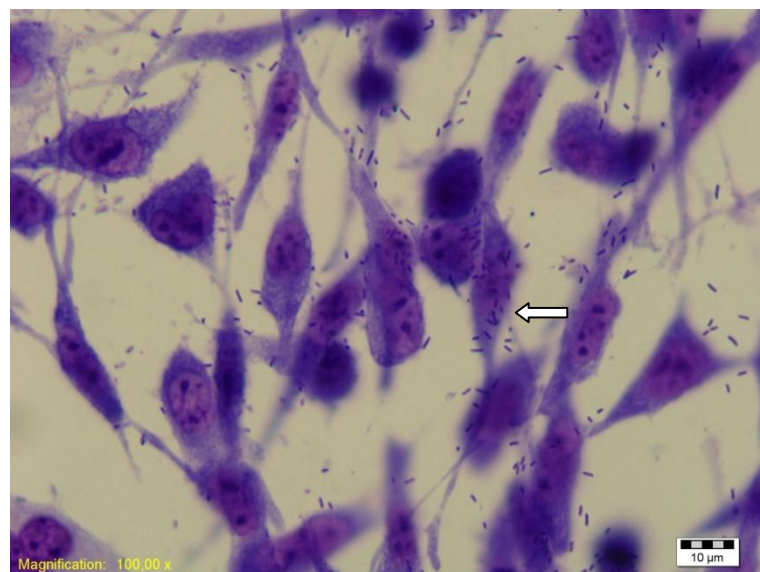


FIGURA 5 – ADESÃO DO TIPO DIFUSA DE DAEC C1845

NOTA - as células HeLa estão com o citoplasma corado em roxo e o núcleo em roxo escuro. As células bacterianas aparecem como estruturas menores coradas em azul. A seta indica bactérias com adesão difusa.

FONTE: O autor (2014)

A finalidade destes ensaios foi reconhecer os distintos padrões observados em *E. coli* visando verificar se estes tipos de adesão ocorrem em *Aeromonas* nas condições estabelecidas para estudo (itens 4.3.1 a 4.3.3).

Os ensaios para definir os perfis de adesão em *Aeromonas* foram realizados com células da linhagem HeLa e HRT-18. Os perfis observados estão ilustrados na FIGURA 6

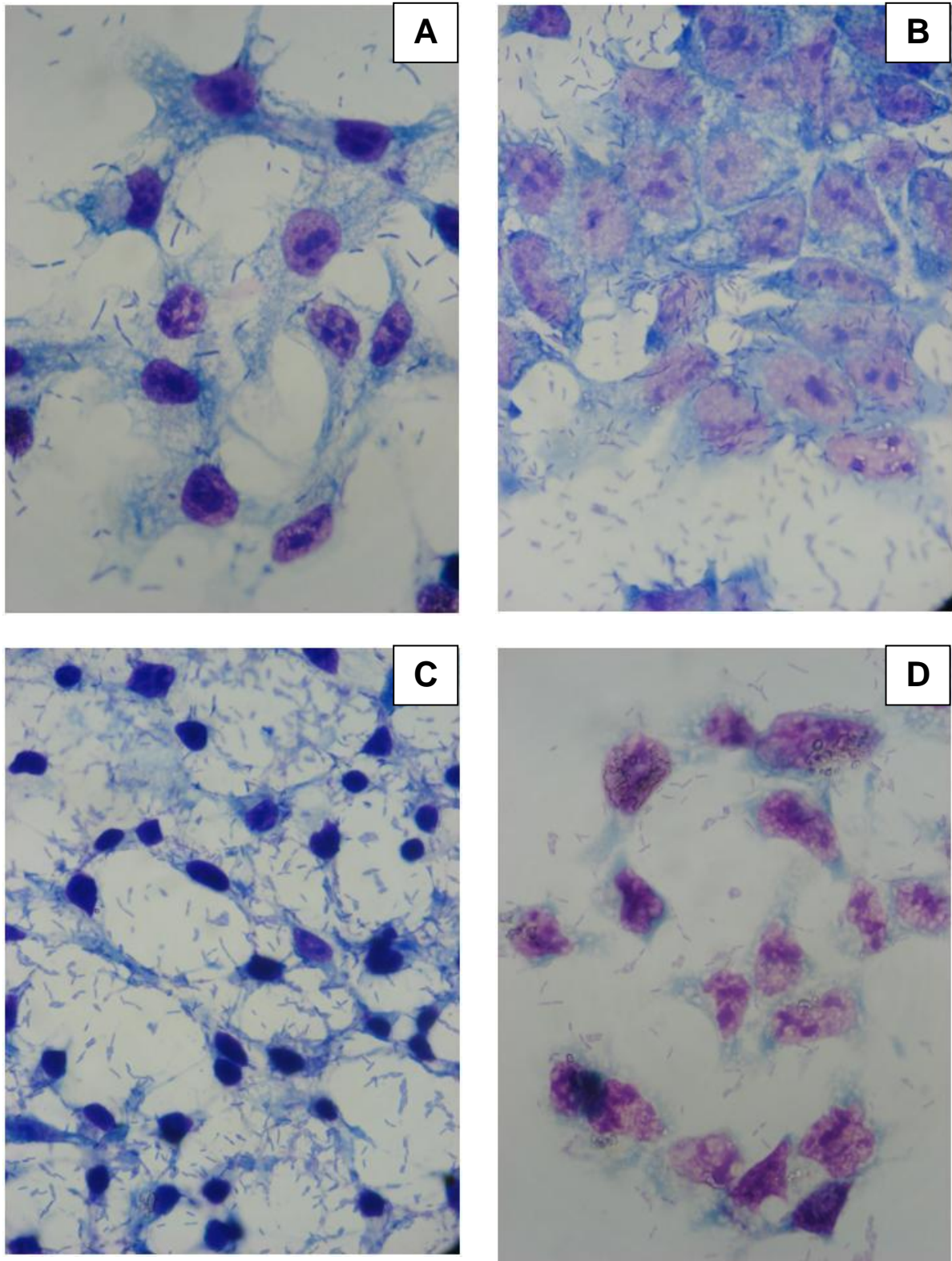


FIGURA 6 - PADRÃO DE ADESÃO DIFUSO E AGREGATIVO DE *AEROMONAS*  
NOTA - difuso em HeLa (A) e HRT-18 (B) e agregativo em HeLa (C) e HRT-18 (D)  
FONTE: O autor (2014)

As figuras mostram que foram identificados dois tipos de adesão entre as estirpes de *Aeromonas*, difuso e agregativo. Os resultados dos ensaios estão resumidos no QUADRO 5.

QUADRO 5 – PERFIS DE ADESÃO DE ESTIRPES DE *AEROMONAS*

Estirpes	Linhagens celulares	
	HeLa	HRT-18
AH 7966, AH 93C, AH F2, AH 297M, AH 1, AVS 20, AVS 49H, AC 73, AVS 55M, AVS 70, AVS 35, AVS 39, AC 46, AC 50, AC 62, AC 423M, AC 23, AC 67, AC 235M, AC 346M, AC 34LM, AC 248C, AH 49, AC 22	Difuso	Difuso
AH 92C, AH 63, AVS 26, AVS 312M, AT 2, AT 1999, AC 6, AC 19, AC 14486, AC 8LM, AC 359M, AC 14, AC 252C, AT 7	Agregativo	Agregativo
AH 44, AH 5LM, AVS 40, AC 43	ND	Difuso

ND – não determinado devido à ocorrência de desadesão

Os resultados indicam que 24 estirpes apresentaram padrão de adesão difusa e 14 o padrão agregativo. Cada estirpe manteve o mesmo padrão de adesão nas linhagens HeLa e HRT-18. Quatro estirpes tiveram o padrão de adesão avaliado apenas em HRT-18, e apresentaram adesão do tipo difusa. A análise não foi possível em células HeLa devido à desadesão celular. Portanto as *Aeromonas* em estudo apresentam predominantemente adesão difusa, observada em 28 (66,7%) estirpes.

Os resultados do perfil de adesão de acordo com a espécie estão indicados na TABELA 3



TABELA 3 - PERFIL DE ADESÃO DE ESPÉCIES DE *AEROMONAS*

Espécie	Padrão Agregativo		Padrão Difuso	
	HeLa	HRT-18	HeLa	HRT-18
AH (10)	2	2	6	8*
AVS (9)	2	2	6	7*
AT (3)	3	3	0	0
AC (20)	7	7	12	13*

NOTA - AH – *A. hydrophila*; AVS – *A. veronii* sobria; AT – *A. trota*; AC – *A. caviae*; entre parênteses está indicado o número de estirpes de cada espécie; \*diferença devida às estirpes que causaram desadesão de células HeLa.

A adesão do tipo agregativo foi observada entre as 4 espécies de *Aeromonas* analisadas, e encontrada em todas as estirpes de *A. trota*. O padrão difuso foi detectado na maioria das estirpes de *A. hydrophila*, *A. veronii* sobria e *A. caviae*.

A ocorrência desses dois padrões de adesão em estirpes de *Aeromonas* já foi relatada na literatura. NEVES, NUNES e MILHOMEN (1994) que realizaram ensaios de adesão com 10 isolados de *Aeromonas* spp (5 *A. hydrophila*, 2 *A. sobria* e 3 *A. caviae*, de origem clínica e ambiental) em células HEp-2 observaram que 3 estirpes de *A. hydrophila* (um isolado de urina e 2 de fezes) e 2 de *A. sobria* (isolado de fezes) exibiram padrão de adesão agregativo e adesão superior a 10 bactérias/célula. As *A. caviae* e *A. hydrophila* isoladas de água e ferida apresentaram padrão difuso e adesão menor que 10 bactérias/célula. Isto sugere que possa haver alguma relação entre o padrão de adesão e virulência.

COUTO et al (2007) realizaram ensaio de adesão com 27 isolados de *A. caviae* e 23 de *A. hydrophila* (88% provenientes de vegetais) em células HT-29 e Caco-2. Relataram que 60% das estirpes apresentaram padrão de adesão agregativo em células Caco-2, especialmente nas bordas celulares e sobre a lamínula, enquanto que nas células HT-29, 60% das estirpes apresentaram padrão de adesão difuso, geralmente com um baixo número de bactérias por célula (<10). Portanto, sugere que o padrão de adesão poderia ser influenciado pela linhagem celular, o que não foi observado neste estudo. Os mesmos autores relataram que *A.*

*hydrophila* de fezes e *A. caviae* de vegetais apresentaram padrão de adesão difuso em células HT-29 e agregativo em Caco-2, enquanto os isolados de água apresentaram padrão de adesão difuso em ambas as linhagens. Como citado anteriormente, no presente estudo as estirpes mantiveram o mesmo padrão de adesão em ambas as linhagens, no entanto não foram realizados ensaios com a linhagem Caco-2.

THORNLEY et al. (1996) que estudaram a adesão em 24 isolados clínicos de *A. caviae* em células HEp-2 e Caco-2 sugerem que o padrão de adesão esteja relacionado à fase de crescimento bacteriano e relatam que na fase log um maior número de bactérias apresenta padrão de adesão agregativo, enquanto que na fase estacionária o padrão difuso é mais frequente. Isto poderia justificar os nossos achados que mostram predomínio de estirpes com adesão difusa. No entanto nenhuma das 3 estirpes de *A. trota* apresentou esse padrão. Em *E. coli* os padrões de adesão são característicos para cada patotipo de estirpes diarreogênicas, isto é, *E. coli* enteropatogênica (EPEC) está associada com a adesão localizada, *E. coli* que adere difusamente (DAEC) com adesão difusa e *E. coli* enteroagregativa (EAEC) com o padrão de adesão agregativo (PIAZZA et al., 2010). Este não parece ser o caso entre as estirpes de *Aeromonas*.

### 5.1.3 Produção de efeitos citotóxicos

*Aeromonas* são capazes de produzir uma variedade de fatores de virulência incluindo hemolisinas, enterotoxinas citotóxicas e citotônicas, proteases, além de proteínas efetoras transferidas às células hospedeiras através dos sistemas de secreção tipo 3 e 6, entre outros (JANDA e ABBOTT, 2010; ROSENZWEIG e CHOPRA, 2013), capazes de provocar danos ao hospedeiro. A capacidade de *Aeromonas* provocar dano em linhagens celulares já foi observada em diversos estudos (ALBERT et al., 1995; CASTILHO et al., 2009; OTTAVIANI et al., 2011; KRZYMINSKA et al., 2011).

Durante a análise microscópica das lâminas foi possível observar a ocorrência de alterações morfológicas nas células HeLa e HRT-18, representadas nas FIGURAS 7 a 8.

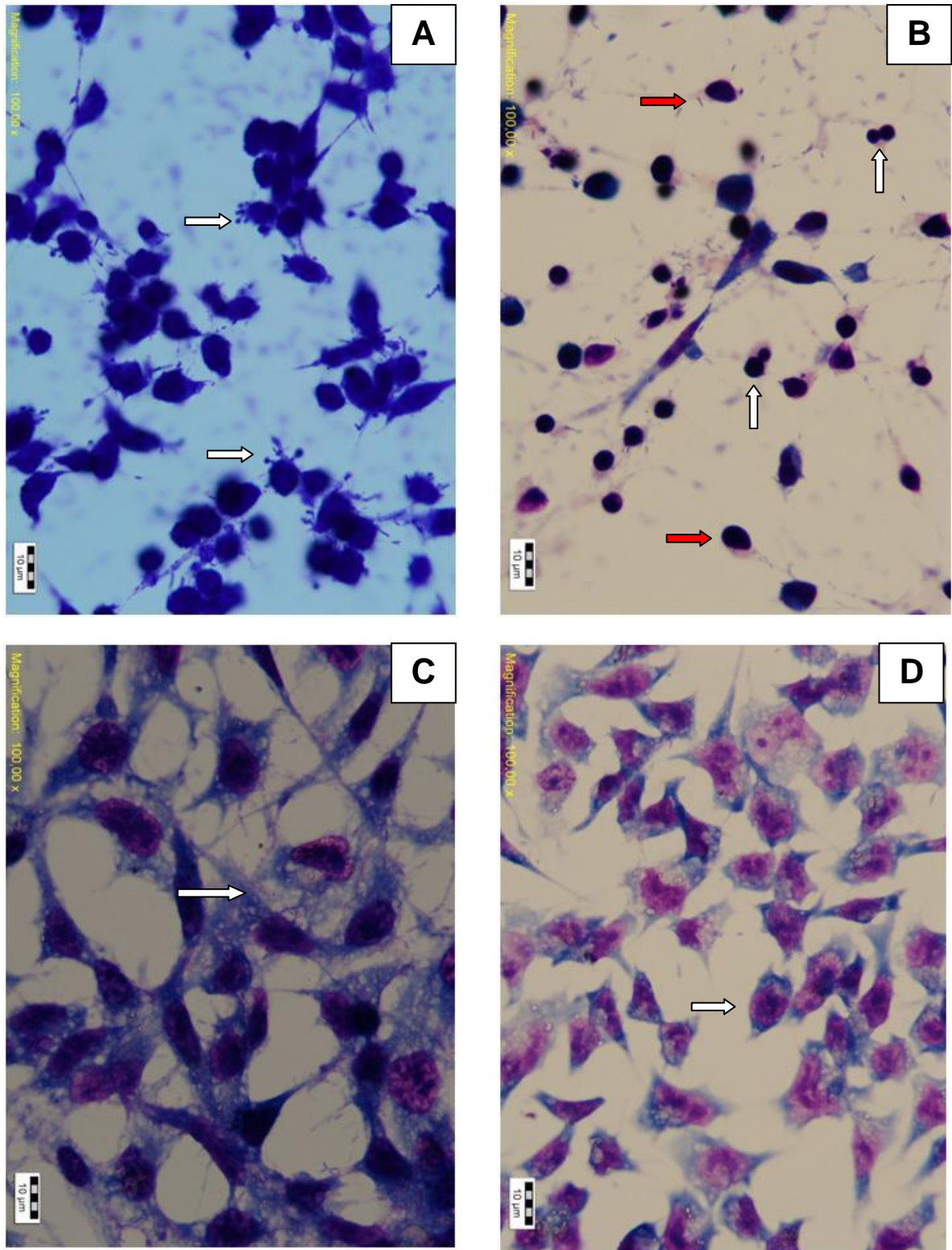


FIGURA 7 – ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS OBSERVADAS EM CÉLULAS HELA E HRT-18

NOTA - A: as setas indicam a presença de *blebs* em HeLa; B: condensação (setas vermelhas) e fragmentação nuclear (setas brancas) em HeLa; C: a seta indica vacuolização em HeLa; D: a seta indica arredondamento e retração de citoplasma em HRT-18

FONTE: O autor (2014)

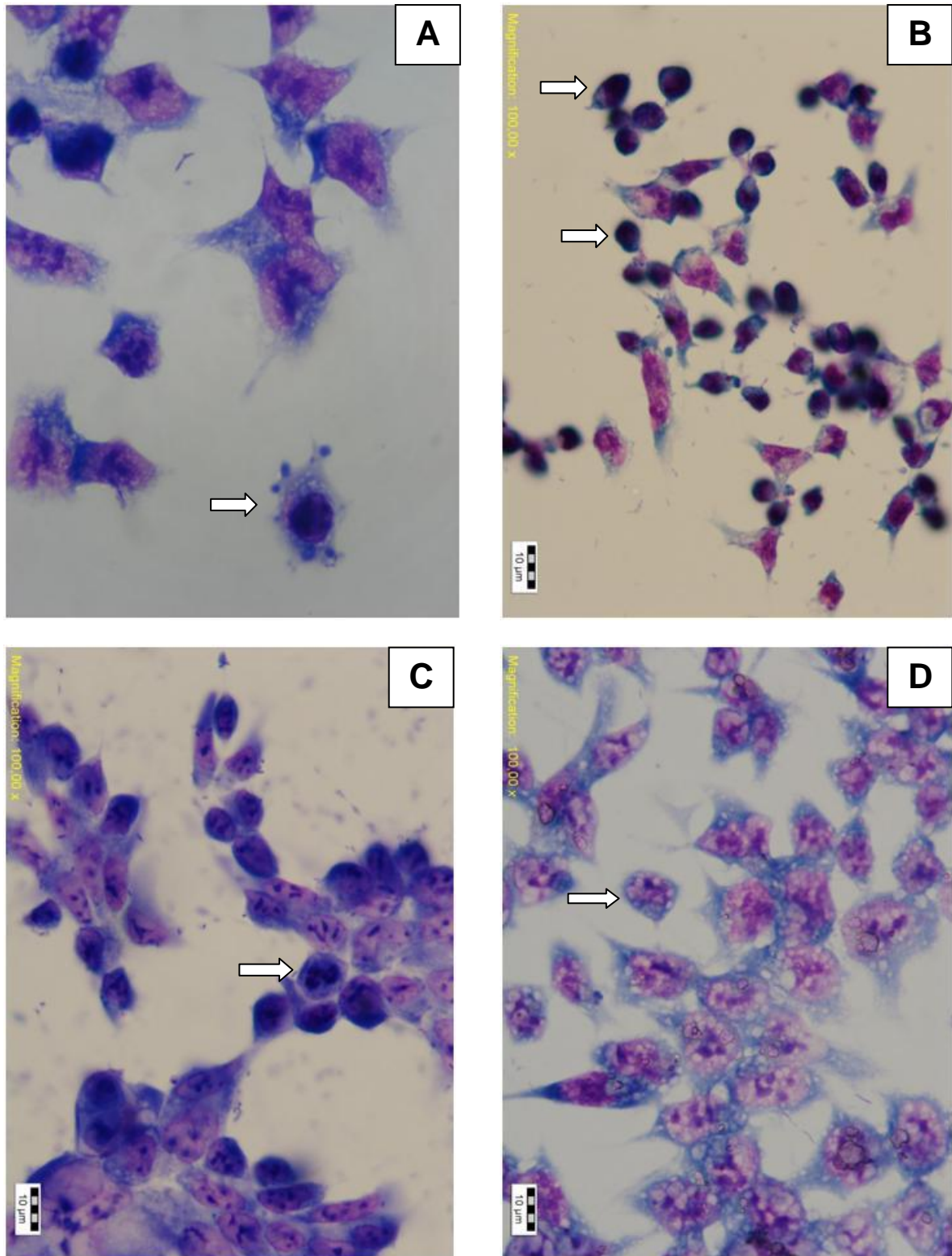


FIGURA 8 – ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS OBSERVADAS EM CÉLULAS HRT-18

NOTA – A: a seta indica a presença de *blebs*; B: a seta indica condensação nuclear; C: a seta indica fragmentação nuclear; D: a seta indica vacuolização

FONTE: O autor (2014)

Os efeitos observados para cada uma das estirpes estão resumidos no QUADRO 6.

QUADRO 6 – ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS PROVOCADAS POR ESTIRPES DE *AEROMONAS* SOBRE CÉLULAS HELA E HRT-18 (CONTINUA)

Estirpes	Alterações morfológicas observadas	
	HeLa	HRT-18
<b>AH 7966</b>	Arredondamento, retração de citoplasma, <i>blebs</i> , condensação e fragmentação nuclear	Arredondamento, retração de citoplasma, condensação e fragmentação nuclear
<b>AH 93C, AH F2, AH 297M</b>	Arredondamento, retração de citoplasma, condensação e fragmentação nuclear	Arredondamento, retração de citoplasma, condensação e fragmentação nuclear
<b>AH 1, AH 92C, AC 359M</b>	Arredondamento, retração de citoplasma, condensação e fragmentação nuclear	Arredondamento, retração de citoplasma, condensação nuclear, vacuolização
<b>AH 44, AH 5LM</b>	Intensa citotoxicidade, desadesão celular total	Arredondamento, retração de citoplasma, condensação nuclear
<b>AH 63</b>	Arredondamento, retração de citoplasma, <i>blebs</i> , condensação e fragmentação nuclear	Arredondamento, retração de citoplasma, condensação nuclear
<b>AVS 20, AVS 49H, AC 73</b>	Arredondamento, retração de citoplasma, <i>blebs</i> , condensação e fragmentação nuclear	Arredondamento, retração de citoplasma, <i>blebs</i> , condensação nuclear
<b>AVS 26</b>	Arredondamento, retração de citoplasma, condensação nuclear	Arredondamento, retração de citoplasma, condensação nuclear
<b>AVS 312M, AC 8LM</b>	Arredondamento discreto	<u>Morfologia típica</u>

QUADRO 6 – ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS PROVOCADAS POR ESTIRPES DE *AEROMONAS* SOBRE CÉLULAS HELA E HRT-18 (CONTINUAÇÃO)

Estirpes	Alterações morfológicas observadas	
	HeLa	HRT-18
<b>AVS 55M,</b> <b>AVS 39,</b>  <b>AT 1999,</b> <b>AC 235M,</b> <b>AC 423M</b>	Arredondamento, retração de citoplasma, condensação nuclear	<u>Morfologia típica</u>
<b>AVS 70,</b>  <b>AC 19,</b>  <b>AC 14</b>	Arredondamento, retração de citoplasma, <i>blebs</i> , condensação nuclear	<u>Morfologia típica</u>
<b>AVS 35,</b>  <b>AC 6</b>	Arredondamento, retração de citoplasma, condensação nuclear	Arredondamento, retração de citoplasma, condensação nuclear, vacuolização
<b>AVS 40,</b>  <b>AC 43</b>	Intensa citotoxicidade, desadesão celular total	<u>Morfologia típica</u>
<b>AT 2,</b>  <b>AC 22</b>	Arredondamento, retração de citoplasma, condensação e fragmentação nuclear	Arredondamento, retração de citoplasma, condensação nuclear
<b>AC 46</b>	Vacuolização	Arredondamento discreto
<b>AC 50,</b>  <b>AC 62</b>	Arredondamento, retração de citoplasma, <i>blebs</i> e corpos apoptóticos, condensação nuclear	Arredondamento discreto
<b>AC 14486</b>	Arredondamento, retração de citoplasma, <i>blebs</i> , condensação e fragmentação nuclear	Vacuolização discreta
<b>AC 23</b>	Arredondamento discreto	Vacuolização



QUADRO 6 – ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS PROVOCADAS POR ESTIRPES DE *AEROMONAS* SOBRE CÉLULAS HELA E HRT-18 (CONCLUSÃO)

	Alterações morfológicas observadas	
Estirpes	HeLa	HRT-18
AC 67	Arredondamento, retração de citoplasma, condensação e fragmentação nuclear	Arredondamento, retração de citoplasma, <i>blebs</i> , condensação nuclear
AC 346M, AC 34LM	Arredondamento, retração de citoplasma, condensação e fragmentação nuclear	Vacuolização
AC 248C, AC 252C	Vacuolização	<u>Morfologia típica</u>
AH 49	Arredondamento, retração de citoplasma, <i>blebs</i> , condensação e fragmentação nuclear	Arredondamento e retração de citoplasma discreto, vacuolização
AT 7	Arredondamento, retração de citoplasma, condensação nuclear	Arredondamento e retração de citoplasma discreto, vacuolização

FONTE: O autor (2014)

As informações no QUADRO 6 indicam que as estirpes variam quanto a capacidade de causar efeitos citotóxicos, e também em relação ao efeito provocado em células das linhagens HeLa e HRT-18.

Arredondamento discreto em células HeLa e vacuolização em HRT-18 foram observados para a estirpe AC 23. Esta bactéria apresentou baixos níveis de adesão (TABELA 1), com padrão difuso. Além disso, entre os parâmetros de virulência avaliados (WOLF, 2012) e apresentados no QUADRO 1 contém apenas *lip* e *ela* que codificam respectivamente para a lipase e elastase, sugerindo que essa estirpe apresente baixo potencial de virulência, o que é compatível com os efeitos observados. Entretanto a vacuolização também foi descrita em estirpe de *A. hydrophila* não enterotoxigênica em células intestinais Caco-2 e foi sugerido que essa característica possa desempenhar um papel na virulência (GUIMARÃES et al.,

2002). A presença de vacúolos em HeLa e morfologia típica ou discreto arredondamento em HRT-18 foram observados nos ensaios com AC 46 (*act*, *lip*, *ela*), AC 252C (*lip*, *ela*) e AC 248C (*lip*, *ela*). Enquanto as duas primeiras aderiram às células HeLa e HRT-19, a última apresentou baixa adesão. AC 46 e AC 248C apresentaram padrão de adesão difuso e AC 252C agregativo.

As estirpes (AVS 312M, AC 8LM) provocaram efeitos morfológicos discretos em células HeLa e nenhum efeito detectado visualmente em HRT-18. A estirpe AC 8LM apresenta o genótipo *vasH*, *lip*, *ela* indicando que é capaz de produzir além da lipase e elastase o Sistema de secreção tipo seis (SST6). Já a estirpe AVS 312M apresenta um arsenal ainda maior de características de virulência incluindo *ascV*, marcador para a presença de Sistema de secreção tipo três (SST3), *act* que codifica uma enterotoxina citotóxica, *aerA* que codifica uma hemolisina, além da elastase. A produção destes fatores está associada com citotoxicidade (CASTILHO et al., 2009, ROSENZWEIG e CHOPRA, 2013). Ambas as estirpes apresentaram padrão de adesão agregativo (QUADRO 5). A estirpe AC 23 também produziu arredondamento discreto em HeLa, mas causou vacuolização em HRT-18. Considerando as características de virulência dessas estirpes seria esperado que AC 8LM, que apresenta um SST6 completo como mostrado pelo sequenciamento do genoma (dados não publicados) e AVS 312M que contém SST3, ambos associados com virulência em *Aeromonas* (SIERRA et al., 2007, SUAREZ et al., 2010) apresentassem efeitos citotóxicos mais intensos. Além disso, ambas as estirpes aderiram às 2 linhagens com valores elevados de células infectadas e de bactérias por célula infectada (TABELA 1), enquanto que para AC 23 foram encontrados baixo número de células aderentes e proporção de células infectadas inferior a observada para as AC 8LM e AVS 312M. Portanto, aparentemente a adesão não foi o fator associado com a ausência de manifestações tóxicas nas 2 estirpes.

As estirpes AVS 55M (*vasH*, *alt*, *ast*, *act*, *lip*, *ela*, *aerA*, *hlyA*), AVS 39 (*act*), AT 1999 (*lip*, *aerA*), AC 235M (*lip*, *ela*) e AC 423M (*vasH*, *lip*, *ela*) provocaram arredondamento, retração de citoplasma, condensação nuclear em células HeLa mas aparentemente nenhum efeito em HRT-18, diferente da estirpe AVS 26 (*ascFG*, *ascV*, *act*) que provoca as mesmas características citotóxicas em ambas as linhagens. A última estirpe contém marcadores do SST3, além da enterotoxina *act*, fatores associados com virulência (ROSENZWEIG e CHOPRA, 2013). Apresenta



adesão agregativa e adere bem em HeLa e HRT-18. As estirpes AVS 55M e AC 423M apresentam marcador para o SST6, mas enquanto a primeira apresentou bons níveis de adesão em ambas as linhagens, a última foi pouco aderente (ou não-aderente) (TABELA 1). Ambas apresentaram adesão difusa. Além disso, AVS 55M apresenta potencialmente a capacidade de produzir um arsenal de toxinas incluindo enterotoxinas (*act*, *alt* e *ast*), e hemolisinas (*aerA*, *hlyA*) além da lipase e elastase. Estirpes com potencial de virulência reduzido em relação à AVS 55M, como AT 1999 (*lip*, *aerA*), AC 235M (*lip*, *ela*) produziram os mesmos efeitos citotóxicos e limitados à linhagem HeLa. Apresentam respectivamente, adesão difusa e agregativa. A primeira apresenta boa adesão e a segunda um menor número de células aderidas. Aparentemente a linhagem HeLa apresenta maior suscetibilidade aos produtos tóxicos produzidos por *Aeromonas*.

Efeitos similares, arredondamento, retração de citoplasma, condensação nuclear em HeLa acrescidas de vacuolização em HRT foram observadas em AVS 35 (*act*, *aerA*), AC 6 (*ast*, *lip*, *ela*) e AT 7 que nenhum apresenta nenhum dos genes de virulência pesquisados por WOLF (2012) e que causou efeitos pouco mais discretos na última linhagem. A estirpe AVS 35 apresenta baixa adesão e padrão difuso, AC 6 bons níveis de adesão e padrão agregativo enquanto AT 7 apresenta baixa a moderada adesão com padrão agregativo.

Além dos efeitos citotóxicos acima foi observada a formação de *blebs* ,em células HeLa infectadas pelas linhagens AVS 70 (*act*, *lip*, *ela*, *aerA* ), AC 19 (*alt*, *lip*, *ela*, *hlyA*) e AC 14 (*lip*, *ela*), que não causaram efeitos visíveis em HRT-18. Todas as estirpes aderiram e AVS 70 apresentou perfil difuso ao passo que as últimas, perfil agregativo. AVS 70 e AC 19 tem a capacidade de produzir toxinas (Act, Alt, AerA, HlyA) o que é compatível com o desenvolvimento de efeitos tóxicos. No entanto estes foram observados apenas em HeLa. Além disso, esse mesmo efeito não seria esperado em AC 14. Portanto parece não haver uma relação considerando o efeito citotóxico e os genes de virulência que foram identificados nas estirpes em estudo.

As estirpes AC 50 (*lip*) e AC 62 (*ast*, *lip*, *ela*, *aer*) provocaram arredondamento, retração de citoplasma, *blebs* e corpos apoptóticos, condensação nuclear em HeLa e apenas arredondamento discreto em HRT-18. Ambas apresentaram baixa aderência, em particular AC 62, e ambas apresentaram perfil de

adesão difuso (QUADRO 5). Como discutido acima, não há relação entre os efeitos e o perfil de genes de virulência conhecidos nas estirpes.

Nos ensaios com as estirpes AH 93C (*ascV*, *vasH*, *alt*, *ast*, *act*, *lip*, *ela*, *aer*, *aerA*, *hlyA*), AH F2 (*ascV*, *vasH*, *alt*, *ast*, *lip*, *ela*, *hlyA*), AH 297M (*ascV*, *vasH*, *alt*, *ast*, *lip*, *ela*, *hlyA*), AH 1 (*vasH*, *ast*, *act*, *lip*, *ela*, *aerA*, *hlyA*), AH 92C (*vasH*, *alt*, *lip*, *ela*, *aerA*, *hlyA*), AC 359M (*vasH*, *lip*, *ela*), AT 2 (*aerA*), AC 22 (nenhum dos genes), AC 67 (*lip*, *ela*), AC 346M (*lip*, *ela*), AC 34LM (*lip*, *ela*), os efeitos foram arredondamento, retração de citoplasma, condensação e fragmentação nuclear em HeLa. A maioria desses efeitos também foi observada em HRT-18, exceto no caso das estirpes AC 346M e AC 34LM (QUADRO 6). As estirpes apresentaram adesão em níveis moderados, e padrão difuso exceto para AH 92C, AC 359M e AT2 que mostraram padrão agregativo (QUADRO 5). Entretanto a variação apresentada no número e tipo de genes de virulência conhecidos e associados com estas estirpes não justifica os efeitos citotóxicos similares em todas.

Os seguintes efeitos foram observados nas culturas de células HeLa infectadas com as estirpes AH 7966 (*vasH*, *alt*, *ast*, *act*, *lip*, *ela*, *aer*, *aerA*, *hlyA*), AH 63 (*ast*, *lip*, *ela*, *hlyA*), AVS 20 (*ascFG*, *ascV*, *act*, *aerA*), AVS 49H (*ascFG*, *ascV*, *act*, *aerA*), AC 73 (*ascFG*, *ascV*, *act*, *aerA*) e AH 49 (nenhum dos genes) e AC 14486 (*vasH*, *lip*, *ela*), arredondamento, retração de citoplasma, *blebs*, condensação e fragmentação nuclear. Em HRT-18 a maioria desses efeitos foi observado, mas houve variações. Em particular as estirpes AC 14486 e AH 49 provocaram efeitos mais discretos em HRT-18 (QUADRO 6). Novamente percebe-se o contraste em relação aos efeitos observados sobre as linhagens celulares e o genótipo das estirpes, em particular quando se compara AH 7966 e AH 49. Nenhuma das estirpes apresentou adesão em números elevados, e a estirpe AH 49 foi a que apresentou o menor valor para adesão (0,03 de BC) entre todas aquelas estudadas no presente trabalho. Exceto pelas estirpes AH 63 e AC 14486, todas as outras apresentaram perfil de adesão difuso (QUADRO 5)

Intensa citotoxicidade resultando em desadesão celular total em HeLa, e arredondamento, retração de citoplasma e condensação nuclear em HRT-18 foram observados para as estirpes AH 44 (*ascV*, *ast*, *lip*, *ela*, *hlyA*) e AH 5LM (*ascV*, *alt*, *ast*, *lip*, *ela*, *hlyA*), enquanto que AVS 40 (*act*, *ela*, *aerA*) e AC 43 (*act*, *ela*, *aerA*) não

causou efeitos observáveis ao microscópio óptico na última linhagem. Todas apresentaram bons índices de adesão com padrão difuso em HRT-18 (TABELA 1).

A indução da apoptose é considerada um mecanismo de virulência de patógenos bacterianos que pode causar dano tecidual e facilitar a colonização.

A capacidade de *Aeromonas* provocar apoptose em linhagens celulares foi observada em diversos estudos. KRZYMINSKA et al., (2011) descreveram que *Aeromonas* provocam apoptose em células HT-29, causando mudanças morfológicas como retração celular, perda de adesão, *blebbing* e fragmentação do DNA. No entanto essa capacidade também foi associada com proteínas específicas.

Isto foi comprovado para a enterotoxina citolítica (Ahcytoen), que não compõem o grupo de genes de virulência cuja presença é conhecida nas estirpes estudadas neste trabalho. Ahcytoen induz apoptose através da produção de espécies reativas de oxigênio e radical óxido nítrico que lesam a membrana mitocondrial (KINGOMBE et al., 1999; KRZYMINSKA et al., 2011). A proteína efetora AexU secretada pelo SST3 causa reorganização da actina e arredondamento celular, condensação da cromatina e ativação das caspases 3 e 9, compatível com apoptose. A enterotoxina Act também apresenta a capacidade de induzir apoptose em HT-29 e macrófagos. Induz a produção de *blebs* de membrana e ativa caspases 3, 8 e 9. GALINDO et al. (2006) sugerem que Act ative o metabolismo do ácido araquidônico, resultando na ativação da adenilato ciclase e produção de AMP<sub>c</sub>, cujo aumento na concentração intracelular leva à apoptose.

Hcp, um substrato efetor do SST6, provoca apoptose através da ativação da caspase 3 (ROSENZWEIG e CHOPRA, 2013).

KRZYMINSKA et al. (2011) estudaram os efeitos citotóxicos de sobrenadantes da cultura de 31 estirpes de *Aeromonas* spp. isoladas de fezes humanas diarreicas sobre a linhagem celular HT-29. O índice apoptótico mais alto foi detectado em 8 estirpes de 9 de *A. veronii* sobria com o gene da enterotoxina citolítica, 3 de 3 estirpes de *A. hydrophila* com *act* e hemolisina e em 4 de 19 estirpes de *A. caviae*, 2 das quais com *act* e hemolisina. Também foram detectadas 5 estirpes de *A. veronii* sobria, 3 de *A. hydrophila* e 4 de *A. caviae* que causaram dano necrótico às células.

Considerando que vários fatores de virulência de *Aeromonas* podem provocar efeitos citotóxicos observados nesse estudo, e que estirpes que não contêm nenhum dos genes de virulência associados também provocaram tais efeitos, não foi possível fazer uma associação entre a presença de genes de virulência com as alterações morfológicas.

TABELA 4 - EFEITOS CITOTÓXICOS CAUSADOS POR ESPÉCIES DE *AEROMONAS*\*

Espécie	Efeitos em células HeLa								Efeitos em células HRT-18							
	AR	RC	B	CN	FN	D	VA	CA	AR	RC	B	CN	FN	D	VA	CA
AH (10)	8	8	3	8	8	2	0	0	10	10	0	9	4	0	3	0
AVS (9)	8	7	3	7	2	1	0	0	4	4	2	4	0	0	1	0
AT (3)	3	3	0	3	1	0	0	0	2	2	0	1	0	0	1	0
AC (20)	16	14	6	14	6	1	3	2	8	5	2	5	0	0	4	0

NOTA - AR – arredondamento; RC- retração de citoplasma; BL-*blebs*; CN – condensação nuclear; FN – fragmentação nuclear; D – desadesão; VA – vacuolização; CA – corpos apoptóticos; AH – *A. hydrophila*; AVS – *A. veronii* sobria; AT – *A. trota*; AC – *A. caviae*. \*Duas estirpes de *A. hydrophila*, 1 de *A. veronii* sobria e 1 de *A. caviae* provocaram desadesão de células HeLa.

Os resultados mostram que todas as estirpes de *A. hydrophila*, *A. veronii* sobria e *A. trota* foram capazes de causar um ou mais efeitos citotóxicos em células HeLa, isto também foi observado para a maioria das estirpes *A. caviae*. Em células HRT-18 uma estirpe de *A. trota*, 5 de *A. veronii* sobria e 8 de *A. caviae* não causaram nenhum efeito citotóxico aparente nas condições de estudo .

Em resumo, todas as estirpes de *Aeromonas* causaram efeitos citóxicos em células HeLa, o que não foi observado para a linhagem HRT-18. Aparentemente não há relação entre presença dos fatores de virulência descritos nas estirpes estudadas e citotoxicidade. O mesmo parece valer para os valores observados na adesão e o padrão de adesão.

## 5.2 EFEITO DA COMPETIÇÃO COM CARBOIDRATOS NA ADESÃO

A adesão é um estágio crítico para as bactérias patogênicas no desenvolvimento da infecção. As lectinas, que se ligam a estruturas contendo carboidratos na superfície dos tecidos do hospedeiro, representam as adesinas mais

comuns utilizadas pelas bactérias. Estudos de competição com carboidratos são uteis para identificar resíduos envolvidos na adesão.

O efeito da galactose, manose e fucose na adesão de 8 estirpes de *Aeromonas* foi analisado, e os resultados estão indicados na TABELA 5.

Resultados estatisticamente significativos com  $p < 0,001$  foram obtidos em HeLa para as estirpes AH F2 e AVS 49H em presença de manose apresentando respectivamente 55% e 45% de redução na adesão; AT 1999 e galactose com 62% de redução; e AC 8LM e fucose com 62% de redução na adesão. Em HRT-18 redução significativa na adesão foi observada apenas para a estirpe AVS 49H com os 3 carboidratos, sendo a redução com galactose de 39%, manose 46% e fucose 44%.

Esses resultados sugerem que as estirpes provavelmente apresentam adesinas distintas que reconhecem receptores diferentes em HeLa e HRT-18.

A inibição da adesão de estirpes de *Aeromonas* em ensaios de competição com galactose, manose e fucose foi observada por NISHIKAWA et al (1994) utilizando células Caco-2. A fucose inibiu a adesão de 4 estirpes às células Caco-2.

Em resumo, os resultados mostraram que as estirpes de *Aeromonas* apresentam habilidade de aderir igualmente em ambas as linhagens celulares utilizadas, embora em níveis distintos. Aparentemente múltiplos mecanismos podem estar envolvidos na adesão, como sugerido pelos resultados dos ensaios com tripsina, metaperiodato e competição com carboidratos. A maior parte das estirpes provocou efeitos citotóxicos em células HeLa e menor número também em HRT-18, sugerindo que sejam potencialmente patogênicas.

TABELA 5 - EFEITO DA ADIÇÃO DOS CARBOIDRATOS NA ADEÇÃO

Linhagens celulares								
Estirpes	HeLa				HRT-18			
	Controle	Galactose	Manose	Fucose	Controle	Galactose	Manose	Fucose
AH F2	5,5 ± 0,9	3,7 ± 0,4	<b>2,6 ± 0,2 ***</b>	2,8 ± 0,4	3,3 ± 0,5	2,8 ± 0,1	2,4 ± 0,2	2,6 ± 0,2
AH 297M	6,3 ± 2,5	5,2 ± 1,2	4,9 ± 1,4	5,2 ± 0,7	5,6 ± 1,4	3,8 ± 0,7	4,0 ± 1,1	3,3 ± 1,2
AVS 49H	5,3 ± 0,1	4,8 ± 0,3	<b>2,9 ± 0,5 ***</b>	4,2 ± 0,7	7,2 ± 0,4	<b>4,4 ± 0,8 ***</b>	<b>3,9 ± 0,35 ***</b>	<b>4,0 ± 0,3 ***</b>
AVS 312M	3,7 ± 0,6	2,9 ± 0,33	3,6 ± 0,4	3,1 ± 0,7	8,8 ± 1,4	8,1 ± 0,54	8,2 ± 0,4	6,2 ± 0,5
AT 2	9,2 ± 1,0	7,1 ± 0,8	7,1 ± 0,6	8,2 ± 0,7	10 ± 0,81	7,3 ± 1,9	5,8 ± 2,4	6,8 ± 1,4
AT 1999	8,4 ± 1,7	<b>3,2 ± 1,5 ***</b>	5,5 ± 1,9	4,9 ± 0,7	4,9 ± 2,2	4,1 ± 1,4	5,2 ± 1,8	4,7 ± 0,9
AC 8LM	9,4 ± 2,3	6,8 ± 2,2	5,3 ± 1,1	<b>3,6 ± 0,9 ***</b>	12 ± 6,7	9,4 ± 5,4	5,9 ± 2,1	4,4 ± 1,5
AC 359M	13,5 ± 3,3	10,4 ± 2,5	8,5 ± 0,9	8,7 ± 1,8	20 ± 8,1	17 ± 7,4	12 ± 1,2	18 ± 5,6

NOTA - os resultados representam a média ±desvio padrão, foi utilizado teste ANOVA one-way e pós-teste de Tukey para comparar o controle aos carboidratos; \*\*\*e negrito indicam  $p < 0,001$

### 5.3 EFEITO DA TRIPSINA SOBRE A ADESÃO DE *AEROMONAS* EM CÉLULAS HELA E HRT-18

Para avaliar um possível efeito da tripsina sobre a capacidade de adesão de *Aeromonas* foram selecionadas as estirpes *A. veronii* sobria AVS 49H e AVS 312M; *A. trota* AT 1999 e AT 2; *A. caviae* AC 8LM e AC 359M e *A. hydrophila* AH 297M e AH F2. As bactérias foram tratadas com tripsina como descrito no item 4.4.2, e a viabilidade foi verificada através de culturas de diluições seriadas realizadas para as estirpes AH F2 ( $1 \times 10^8$  e  $8,8 \times 10^7$  respectivamente controle e tratamento), AVS 312M ( $1,6 \times 10^8$  e  $1,2 \times 10^8$ ) e AC 359M ( $9,7 \times 10^7$  e  $1,1 \times 10^8$ ). Os resultados estão indicados na TABELA 6. Foi considerado como significativo valor de  $p < 0,001$ .

TABELA 6 - EFEITO DO TRATAMENTO COM TRIPSINA NA ADESÃO DAS ESTIRPES BACTERIANAS

Estirpe	Linhagens celulares					
	HeLa			HRT-18		
	Controle	Tratamento	Redução <sup>a</sup>	Controle	Tratamento	Redução <sup>a</sup>
AH F2	5,6 ± 0,5	5,7 ± 0,3	0	4,4 ± 0,6	3,5 ± 0,15	20
AH 297M	8,6 ± 2,0	9,9 ± 2,6	0	8,3 ± 1,4	8,1 ± 0,8	2,4
AVS 49H	4,9 ± 0,45	3,1 ± 0,24	37	4,9 ± 0,3	3,2 ± 0,3	35
AVS 312M	7,1 ± 0,45	3,7 ± 0,56	48	6,4 ± 0,9	2,1 ± 0,08	67
AT 2	8,6 ± 1,8	9,0 ± 1,5	0	6,5 ± 2,3	5,5 ± 1,5	15
AT 1999	9,6 ± 3,8	7,3 ± 2,3	24	6,5 ± 0,4	6,3 ± 0,2	3
AC 8LM	9,7 ± 1,0	<b>4,1 ± 0,6 ***</b>	58	5,9 ± 1,6	<b>2,4 ± 0,5 ***</b>	59
AC 359M	10,8 ± 1,0	8,5 ± 2,1	22	7,6 ± 1,5	6,8 ± 1,1	10

NOTA - os resultados representam a média ± desvio padrão, <sup>a</sup> – redução da adesão após o tratamento em percentual (%); foi utilizado teste T não-pareado para comparar o controle ao tratamento; \*\*\* e negrito indicam  $p < 0,001$

Resultados significativos foram encontrados apenas para a estirpe AC 8LM, para a qual foi observada uma redução de 58% na adesão a células HeLa e 59% para HRT-18. Este resultado sugere que as estirpes analisadas diferem quanto aos

mecanismos utilizados na adesão, e que em 8LM há o envolvimento de moléculas proteicas.

CARRELLO et al (1988) trataram com tripsina 3 estirpes de *Aeromonas* que apresentavam *pili* tipo L e eram altamente aderentes (>10 bactérias/ célula) à células HEp-2. Após o tratamento a adesão foi reduzida entre 59 e 83%. KIROV, HAYWARD e NERRIE (1995) trataram com tripsina 6 estirpes de *Aeromonas* biovar sobria aderentes à células HEp-2 (>10 bactérias/ célula). As bactérias foram cultivadas em TSB com extrato de levedura a 22°C por 48 h, para estimular a produção de *pili*. Após o tratamento com tripsina a adesão foi reduzida acima de 70%.

THORNLEY et al (1996) trataram com tripsina 24 estirpes de *A. caviae* aderentes a células HEp-2 e Caco-2. A tripsinização inibiu a adesão em torno de 78%, presumivelmente pela remoção proteolítica de estruturas proteicas extracelulares.

A participação de flagelos e *pili* já foi implicada na adesão de *Aeromonas* (GRYLLOS et al., 2001; KIROV, CASTRISIOS e SHAW, 2004; JANDA e ABBOTT, 2010)

#### 5.4 EFEITO DO METAPERIODATO DE SÓDIO SOBRE A ADESÃO DE AEROMONAS EM CÉLULAS HELA E HRT-18

O efeito do metaperiodato sobre a adesão das 8 estirpes de *Aeromonas* foi avaliado como descrito em 4.4.3. A 37°C e a 0°C, o metaperiodato de sódio oxida cis-glicóis presentes em carboidratos. A 37°C, no entanto, o metaperiodato também oxida aminoácidos presentes em cadeias polipeptídicas, como cisteína, metionina, triptofano, tirosina e histidina; serina e treonina somente N-terminais (CLAMP e HOUGH, 1965). A oxidação de aminoácidos em peptídios ou proteínas pelo metaperiodato não ocorre a 0°C no escuro (RANHAND, 1974). As condições utilizadas neste trabalho foram estabelecidas através dos estudos de THORNLEY et al (1996), OKOCHI et al (2005) e SUN et al (2010), com modificações.



A viabilidade bacteriana também foi verificada após o tratamento com o metaperiodato para as estirpes AVS 49H ( $1,2 \times 10^8$  e  $1,5 \times 10^8$  respectivamente controle e tratamento) e AT 2 ( $1,1 \times 10^8$  e  $9 \times 10^7$ ). Os resultados dos ensaios de adesão estão indicados na TABELA 7. Foi considerado como significativo valor de  $p < 0,001$ .

TABELA 7 - EFEITO DO TRATAMENTO COM METAPERIODATO DE SÓDIO NA ADESÃO DAS ESTIRPES BACTERIANAS

Estirpes	Linhagens celulares					
	HeLa			HRT-18		
	Controle	Tratamento	Redução <sup>a</sup>	Controle	Tratamento	Redução
AH F2	$5,1 \pm 0,3$	<b><math>1,5 \pm 0,2</math> ***</b>	71	$4,5 \pm 1,0$	$1,4 \pm 0,04$	69
AH 297M	$5,8 \pm 1,0$	<b><math>0,1 \pm 0,1</math> ***</b>	98	$5,2 \pm 1,2$	<b><math>0,2 \pm 0,2</math> ***</b>	96
AVS 49H	$5,5 \pm 0,8$	$1,5 \pm 0,2$	72	$6,3 \pm 0,3$	<b><math>1,4 \pm 0,15</math> ***</b>	77
AVS 312M	$8,4 \pm 0,7$	<b><math>0,1 \pm 0,1</math> ***</b>	99	$4,3 \pm 0,9$	<b><math>0,2 \pm 0,1</math> ***</b>	95
AT 2	$11,0 \pm 1,7$	<b><math>0,5 \pm 0,2</math> ***</b>	95	$6,1 \pm 1,8$	<b><math>0,5 \pm 0,3</math> ***</b>	92
AT 1999	$13,6 \pm 1,8$	<b><math>7,0 \pm 2,4</math> ***</b>	48	$9,0 \pm 1,6$	<b><math>2,5 \pm 1,5</math> ***</b>	72
AC 8LM	$6,7 \pm 1,2$	<b><math>1,8 \pm 0,5</math> ***</b>	73	$5,1 \pm 0,9$	$3,1 \pm 0,3$	39
AC 359M	$14,2 \pm 1,0$	<b><math>5,7 \pm 1,0</math> ***</b>	60	$11,1 \pm 2,2$	<b><math>2,8 \pm 0,7</math> ***</b>	75

NOTA - os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão, <sup>a</sup> – redução da adesão após o tratamento em percentual (%); foi utilizado teste T não-pareado para comparar o controle ao tratamento; \*\*\* e negrito indicam  $p < 0,001$

Valores significativamente menores em relação ao controle foram encontrados para as estirpes AH 297M, AVS 312M, AT 2, AT 1999 e AC 359M em ambas as linhagens. Para AH F2 e AC 8LM este efeito só observado em HeLa e para AVS 49H apenas em HRT-18.

Segundo THORNLEY et al (1996) a exposição de 24 *A. caviae* aderentes ao metaperiodato de sódio reduziu em torno de 68% a adesão a células HEP-2 e Caco-2, possivelmente devido ao rearranjo e bloqueio de receptores carboidrato na superfície celular bacteriana.

No entanto o lipopolissacarídeo (LPS) tem sido descrito como uma adesina em *Aeromonas*. Foi implicado na adesão em células HEP-2 e na formação de biofilme (GRYLLOS et al., 2001; MERINO et al., 1996 b). Sendo uma estrutura rica

em carboidratos é possível que seja afetado pelo metaperiodato, o que viria a reduzir a sua participação na adesão.

Os flagelos, que reconhecidamente tem atividade na adesão de *Aeromonas* (GRYLLOS et al., 2001, JANDA e ABBOTT, 2010), poderiam ser alvo potencial dos efeitos do metaperiodato. A glicosilação de proteínas foi demonstrada pela primeira vez no final da década de 1930 e acreditava-se existir apenas em eucariotos. Após 40 anos foi descoberta a primeira glicosilação do tipo O-ligada em uma bactéria e mais de 20 anos depois foi descrita a primeira via de N-glicosilação bacteriana em *Campylobacter jejuni* (NOTHAFT e SZYMANSKI, 2010).

GRYLLOS et al (2001) descreveram cinco genes envolvidos com a motilidade, expressão do flagelo e do antígeno O do LPS de *A. caviae*. Três desses genes, *flmA*, *flmB* e *flmD* são homólogos aos genes de glicosilação flagelar de *Caulobacter crescentus*. Mutantes de FlmB resultaram na perda de motilidade, flagelos e adesão, mas sem alterar a expressão do LPS (POWER e JENNINGS, 2003). O locus dos genes *flm* em *A. caviae* são requeridos para a glicosilação da flagelina e a adição de ácido pseudoamínico ao antígeno O do lipopolissacarídio, e *maf1*, uma pseudaminil transferase, é a responsável pela glicosilação da flagelina (TABELI et al., 2009; PARKER et al., 2012). Dessa forma, aparentemente os flagelos apresentam glicosilação em *Aeromonas*. Isto permite especular que com a oxidação dos carboidratos causada pelo metaperiodato a sua função como adesina poderia ser afetada reduzindo o nível de adesão bacteriana às células.

## 5.5 HEMAGLUTINAÇÃO

As 8 estirpes testadas *A. veronii* sobria AVS 49H e AVS 312M; *A. trota* AT 1999 e AT 2; *A. caviae* AC 8LM e AC 359M e *A. hydrophila* AH 297M e AH F2, mostraram bons valores de adesão às células HeLa e HRT-18 (TABELA 1). No entanto a hemaglutinação foi observada apenas para a estirpe AH 297M, sugerindo que essas estirpes apresentam diferentes tipos de moléculas adesivas na sua superfície.

A hemaglutinação da estirpe AH 297M foi inibida na presença de manose ou fucose, mas não na presença de galactose. A inibição da hemaglutinação por carboidratos sugere o envolvimento de lectinas neste processo.

Estudos anteriores mostram que a hemaglutinação causada por *Aeromonas* pode ocorrer com ou sem o envolvimento de *pili*, e proteínas de superfície, não fimbriais, foram associadas com hemaglutinação (CLARK et al., 1989). Também não há relação direta entre adesão e hemaglutinação, uma vez que estirpe altamente aderente não mostrou capacidade de hemaglutinação e algumas estirpes positivas para hemaglutinação não aderem a células epiteliais (NISHIKAWA, KIMURA e KISHI (1991). Ensaio de competição com galactose, manose e fucose, realizados com 8 estirpes mostraram que a fucose inibiu a adesão e a hemaglutinação de 4 estirpes. Uma estirpe aderente não hemaglutinou. A adesão de 2 estirpes não foi inibida pelos carboidratos que inibiram sua hemaglutinação (NISHIKAWA, KIMURA e KISHI (1991). Portanto, as adesinas envolvidas na hemaglutinação e adesão à células epiteliais podem ter características distintas.

O tratamento da estirpe AH 297M com tripsina inibiu a reação de hemaglutinação. A tripsina pertence à família das serina proteases. O seu mecanismo enzimático envolve o reconhecimento de um aminoácido alvo em um nicho de ligação e a subsequente clivagem da ligação amida C-terminal envolvendo um resíduo de serina na enzima. O nicho de ligação da tripsina é profundo e estreito e possui no fundo aspartato negativamente carregado que se liga a aminoácidos básicos via interação iônica. Somente arginina e lisina são positivamente carregadas e possuem cadeias longas que permitem a interação iônica, o que torna a clivagem altamente específica (OLSEN, ONG e MANN, 2004). Como a ação da tripsina cliva proteínas e isto implicou na inibição da hemaglutinação, infere-se que este processo é mediado por proteínas.

CARRELLO et al (1988) realizaram ensaio de hemaglutinação com 63 isolados de *Aeromonas*. Dezesete por cento foram não hemaglutinantes e 70% apresentaram hemaglutinação sensível à manose e fucose e resistente à galactose. A hemaglutinação não foi associada com a presença de *pili*, uma vez que a remoção dos mesmos por quebra mecânica e o tratamento com tripsina não afetaram a hemaglutinação das bactérias testadas. Em relação ao efeito da tripsina o resultado

foi diferente do observado para a estirpe AH 297M, para a qual a participação de *pili* não pode ser excluída.

ATKINSON e TRUST (1980) realizaram ensaio de hemaglutinação com 37 isolados de *Aeromonas hydrophila*. Vinte e duas estirpes produziram hemaglutinação. Foram observadas diferenças na estabilidade das hemaglutininas. Algumas perdiam sua atividade quando eram suspensas em PBS a 25°C por 10 min, enquanto outras eram estáveis por 1 h. As células da estirpe A6, quando coradas a partir de uma placa de hemaglutinação, apresentavam vários *pili*. Células da mesma cultura, suspensas em PBS por 10 min antes da coloração, não apresentavam mais *pili*. A perda de *pili* por A6 coincide com a perda da hemaglutinabilidade. Neste caso, a hemaglutinina está associada a *pili*. Em outras estirpes, a hemaglutinação ocorre na ausência de *pili*, neste caso as hemaglutininas parecem ser proteínas de superfície.

## 5.6 ADESÃO SOBRE MATRIZ EXTRACELULAR

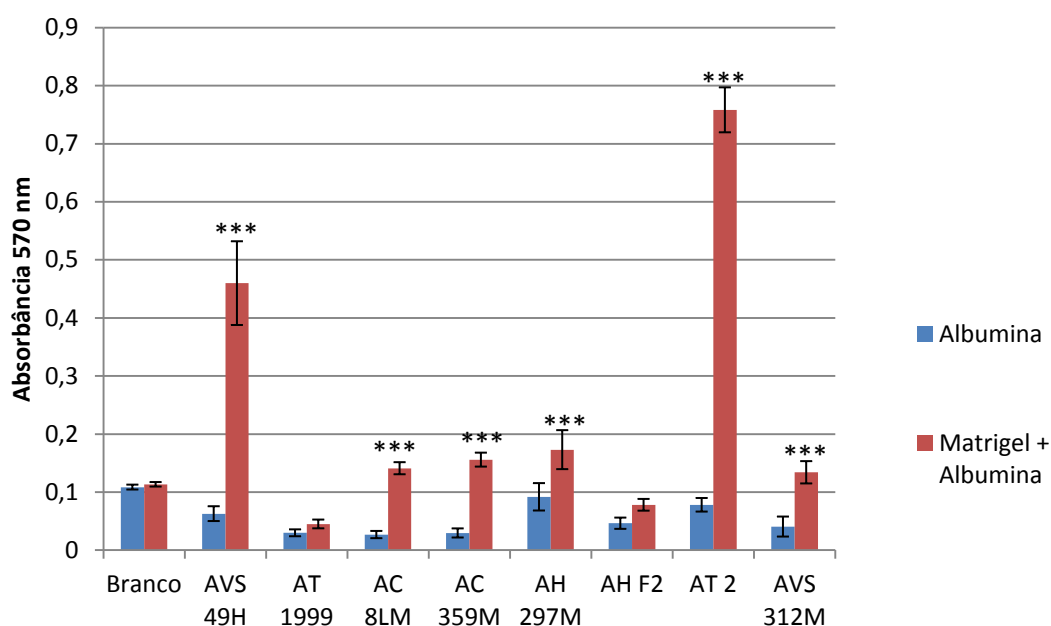
As células produzem e liberam uma variedade de macromoléculas que formam uma rede estrutural complexa no espaço extracelular. Esta matriz extracelular está presente em todos os tecidos e órgãos e fornece não somente suporte físico para as células, mas inicia processos bioquímicos cruciais que são requeridos para a morfogênese do tecido, diferenciação e homeostase (PREISSNER e CHHATWAL, 2000; FRANTZ, STEWART e WEAVER, 2010). No entanto, a matriz-extracelular pode ser utilizada por bactérias patogênicas para colonizar o hospedeiro, particularmente em traumas. Os principais componentes estruturais da matriz extracelular incluem colágenos, laminina, glicoproteínas, proteoglicanas hialuronano e muitos outros componentes. As moléculas de adesão da matriz-extracelular como os colágenos, fibronectinas e outras proteínas da matriz, ou receptores de adesão tais como as integrinas nas células hospedeiras, podem interagir diretamente com bactérias através das adesinas de superfície (PREISSNER e CHHATWAL, 2000).

Para avaliar a capacidade de adesão a matriz extracelular foram selecionadas 8 estirpes de *Aeromonas* (AVS 49H, AT 1999, AC 8LM, AC 359M, AH 297M, AH F2, AT2 e AVS 312M) que foram testadas quanto a habilidade de se ligar a Matrigel.

Matrigel é uma preparação contendo laminina e colágeno tipo IV como componentes principais seguidos por heparan sulfato, entactina e nidogênio. Sua estrutura se assemelha à lâmina densa da membrana basal (KLEINMANN et al., 1986).

Os ensaios foram realizados como descrito no item 4.5, e os resultados estão representados no gráfico abaixo.

GRÁFICO 2 - ADESÃO DE ESTIRPES DE *AEROMONAS* SOBRE MATRIGEL



NOTA - as colunas representam a média e as barras o desvio padrão; os resultados das análises foram descontados da absorbância do branco. Foi utilizado teste T não-pareado comparando a absorbância do Matrigel em relação à Albumina; \*\*\*  $p < 0,001$ . Estes dados representam os resultados de 1 experimento realizado em quadruplicata.

Os resultados mostram que 6 das 8 estirpes testadas ligaram-se significativamente mais ao Matrigel. Esta característica não foi observada apenas

para *A. trota* AT 1999 isolada de líquido e *A. hydrophila* AH F2 isolada de ferida, sugerindo que as estirpes apresentam diferentes tipos de moléculas de adesão na sua superfície.

Segundo ASCENCIO, LJUNGH e WALDSTRÖM (1991) a proporção de estirpes de *Aeromonas* que se liga a diferentes proteínas de matriz extracelular é maior para *A. hydrophila* do que para *A. sobria* ou *A. caviae*. Devido ao baixo número de bactérias analisadas não foi possível avaliar se esse efeito também é válido para a amostra em estudo.

Foi sugerido que a interação de *Aeromonas* com proteínas da matriz extracelular ocorre através de estruturas proteicas da bactéria, uma vez que o tratamento com proteinase K reduziu significativamente a ligação de *A. hydrophila* à fibronectina. O tratamento da bactéria com tripsina reduziu a ligação à laminina, colágeno IV e vitronectina. Isso sugere que *A. hydrophila* possua diferentes receptores de superfície celular para várias proteínas, ou que a habilidade de reconhecer várias proteínas se deva à presença de um tipo de receptor que possui diferentes domínios de ligação (ASCENCIO, LJUNGH e WALDSTRÖM, 1991).

Em 1998, ASCENCIO e WALDSTRÖM isolaram de uma estirpe de *A. hydrophila* uma proteína ligante de colágeno tipo I. Esta proteína é secretada pela bactéria no meio, mas também pode estar frouxamente associada à superfície celular. A ligação ao colágeno é restrita à cadeia  $\alpha 1$  e parece envolver porções açúcar e sequências peptídicas.

ASCENCIO, HIRST e WALDSTRÖM (2000) estudaram uma proteína ligante de colágeno tipo I sintetizada por *A. veronii*, da qual 98% ficam localizadas no meio extracelular e o restante se distribui na superfície celular, no periplasma e ancorada na membrana externa. No sobrenadante do meio de cultivo bacteriano também foram encontradas collagenase e outras proteases. Isso pode sugerir que *A. veronii* expressa ambas, proteína ligante de colágeno e enzimas proteolíticas no início do processo infeccioso quando o máximo de adesão é necessário para colonizar o hospedeiro. Ao longo do processo, a síntese e a secreção de enzimas proteolíticas são intensificadas para atender necessidades nutricionais da bactéria.

Em 2004, VÁSQUEZ-JUÁREZ, ROMERO e ASCENCIO identificaram uma proteína de membrana externa de *A. veronii*, denominada Omp48, com capacidade de se ligar ao colágeno e à fibronectina. A adesão de Omp48 ao colágeno foi diminuída após a incubação com glicoproteínas homólogas e outros carboidratos, sugerindo um domínio ligante tipo lectina. Além disso, bactérias incubadas com antissoro anti-Omp48 reduziram sua adesão a células HeLa. Omp48 também foi encontrada em *A. hydrophila* e *A. caviae*.

## 6 CONCLUSÃO

As 42 estirpes de *Aeromonas* foram capazes de aderir sobre células das linhagens HeLa e HRT-18, mas diferem em relação ao número de bactérias aderidas às células e número de células infectadas. A maioria das estirpes (33 em HeLa e 36 em HRT-18) apresentou baixo nível de adesão (<10 bactéria/célula).

Foram observados dois perfis de adesão, agregativo e difuso, o último observado em 28 das 42 estirpes. Para todas as estirpes o mesmo perfil de adesão foi observado em ambas as linhagens celulares.

As estirpes variaram quanto à capacidade de causar efeitos citotóxicos, e também em relação ao efeito provocado em células das linhagens HRT-18 e HeLa, sendo esta última mais sensível aos produtos tóxicos gerados por *Aeromonas*. As alterações celulares variaram de arredondamento discreto, vacuolização, formação de *blebs* a desadesão celular.

*Aeromonas* com genótipos de virulência distintos provocaram efeitos citotóxicos similares, sugerindo que não há uma relação direta entre os genes de virulência identificados e citotoxicidade nas condições de estudo.

Entre as 8 estirpes para as quais ensaios adicionais foram realizados apenas AH 297M provocou hemaglutinação, sugerindo que as estirpes diferem em relação às moléculas associadas com adesão.

Ensaio de competição com carboidratos, tratamento com tripsina e metaperiodato de sódio causaram redução na adesão de uma ou mais estirpes, sugerindo que essas bactérias provavelmente apresentam adesinas distintas que reconhecem receptores diferentes em HeLa e HRT-18.

Seis das 8 estirpes de *Aeromonas* aderiram ao Matrigel, reforçando a sugestão de que as estirpes apresentam diferentes tipos de moléculas de adesão na sua superfície.



## REFERÊNCIAS

- ABBOTT, S. L.; CHEUNG, W. K. W.; JANDA, J. M. The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 2348-2357, 2003.
- ABRAMI, L.; FIVAZ, M.; GLAUSER, P. E.; PARTON, R. G.; VAN DER GOOT, F. G. A pore-forming toxin interacts with a GPI-anchored protein and causes vacuolation of the endoplasmic reticulum. **The Journal of Cell Biology**, v. 140, n. 3, p. 525–540, 1998.
- ABUD, A. P. R. **Ação in vitro do medicamento homeopático canova em células de medula óssea de camundongos**. 86 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- AGGER, W. A.; MCCORMICK, J. D.; GURWITH, M. J. Clinical and microbiological features of *Aeromonas hydrophila*-associated diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 21, n. 6, p. 909-913, 1985.
- ALBERT, M. J. et al. Characterization of *Aeromonas trota* strains that cross-react with *Vibrio cholerae* O139 Bengal. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 12, p. 3119–3123, dez. 1995.
- ALBERT, M.J., GRANT, T. e ROBINS-BROWNE, R. Studying bacterial adhesion to cultured cells. In: AN, Y. H. e FRIEDMAN, R. J. **Handbook of Bacterial Adhesion - Principles, Methods and Applications**. Totowa: Human Press, 2000. p. 541-552.
- ALSEVER, J. B.; AINSLIE, R. B. A new method for the preparation of dilute blood plasma and the operation of a complete transfusion service. **New York State Journal of Medicine**, v. 41, p. 126-131, 1941.
- ALTWEGG, M.; GEISS, H. K. *Aeromonas* as a human pathogen. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 253-286, 1989.
- ANGEL, M. F.; ZHANG, F.; JONES, M.; HENDERSON, J.; CHAPMAN, S. W. Necrotizing fasciitis of the upper extremity resulting from a water moccasin bite. **Southern Medical Journal**, v. 95, n. 9, p. 1090-1094, 2002.
- ASCENCIO, F.; HIRST, T. R.; WADSTRÖM, T. Production and secretion of collagen-binding proteins from *Aeromonas veronii*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 4, p. 607–616, out. 2000.
- ASCENCIO, F.; LJUNGH, A.; WADSTRÖM, T. Comparative study of extracellular matrix protein binding to *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased fish and human infection. **Microbios**, v. 65, n. 264-265, p. 135–146, 1991.

ASCENCIO, F.; WADSTRÖM, T. A collagen-binding protein produced by *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 417–425, maio 1998.

ASSIS, F. E. A. **Prevalência e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de bactérias enteropatogênicas isoladas no Paraná**. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

ATKINSON, H. M.; TRUST, T. J. Hemagglutination properties and adherence ability of *Aeromonas hydrophila*. **Infection and Immunity**, v. 27, n. 3, p. 938–946, 1980.

BARNETT, T. C.; KIROV, S M. The type IV *Aeromonas* pilus (Tap) gene cluster is widely conserved in *Aeromonas* species. **Microbial Pathogenesis**, v. 26, n. 2, p. 77–84, 1999.

BARNETT, T. C.; KIROV, S M; STROM, M. S.; SANDERSON, K. *Aeromonas* spp. possess at least two distinct type IV pilus families. **Microbial Pathogenesis**, v. 23, n. 4, p. 241–247, 1997.

BAUAB, T. M.; FERNANDES, M.; FALCÃO, D. P. Marcadores de virulência em *Aeromonas* spp. isoladas de materiais clínicos humanos e de água doce. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 22, n. 1, p. 131–145, 2001.

BERTUCCIO, M. P.; PICERNO, I.; SCOGLIO, M. E. Adherence of *Aeromonas hydrophila* strains to human enterocyte-like cells pre-infected with rotavirus. **Journal of Preventive Medicine and Hygiene**, v. 53, n. 3, p. 165–168, set. 2012.

BHOWMIK, P. et al. Pathogenic potential of *Aeromonas hydrophila* isolated from surface waters in Kolkata, India. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. Pt 12, p. 1549–1558, dez. 2009.

BÖNEMANN, G.; PIETROSIUK, A.; MOGK, A. Tubules and donuts: a type VI secretion story. **Molecular Microbiology**, v. 76, n. 4, p. 815–821, maio 2010.

BOYLE, E. C.; FINLAY, B. B. Bacterial pathogenesis: exploiting cellular adherence. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, n. 5, p. 633–639, out. 2003.

BURKE, V. et al. Biotyping and virulence factors in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 1146–1149, maio 1984.

BURR, S. E.; STUBER, K.; FREY, J. The ADP-ribosylating toxin, AexT, from *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* is translocated via a type III secretion pathway. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 22, p. 6583–6591, 2003.

BURR, S. E.; STUBER, K.; WAHLI, T.; FREY, J. Evidence for a type III secretion system in *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 21, p. 5966–5970, 2002.

CARRELLO, A.; SILBURN, K. A.; BUDDEN, J. R.; CHANG, B. J. Adhesion of clinical and environmental *Aeromonas* isolates to HEP-2 cells. **Journal of Medical Microbiology**, v. 26, n. 1, p. 19-27, 1988.

CASTILHO, M. C. B. et al. High frequency of hemolytic and cytotoxic activity in *Aeromonas* spp. isolated from clinical, food and environmental in Rio de Janeiro, Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 96, n. 1, p. 53–61, jun. 2009.

CEYLAN, E.; BERKTAS, M.; AĞAOĞLU, Z. The occurrence and antibiotic resistance of motile *Aeromonas* in livestock. **Tropical Animal Health and Production**, v. 41, n. 2, p. 199-204, 2009.

CHAN, F. K.; CHING, J. Y.; LING, T. K.; CHUNG, S. C.; SUNG, J. J. *Aeromonas* infection in acute suppurative cholangitis: review of 30 cases. **The Journal of Infection**, v. 40, n. 1, p. 69-73, 2000.

CHENG, N.-C.; HORNG, S.-Y.; CHANG, S.-C.; TANG, Y.-B. Nosocomial infection of *Aeromonas hydrophila* presenting as necrotizing fasciitis. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 103, n. 1, p. 53-57, 2004.

CHIM, H.; SONG, C. *Aeromonas* infection in critically ill burn patients. **Burns: Journal of the International Society for Burn Injuries**, v. 33, n. 6, p. 756-759, 2007.

CHOPRA, A K; HOUSTON, C. W. Purification and partial characterization of a cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 7, p. 719-727, 1989.

CHOPRA, A K; XU, X.; RIBARDO, D. et al. The cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila* induces proinflammatory cytokine production and activates arachidonic acid metabolism in macrophages. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 5, p. 2808-2818, 2000.

CHOPRA, ASHOK K; GRAF, JOERG; HORNEMAN, AMY J; JOHNSON, J. A. Virulence factor-activity relationships (VFAR) with specific emphasis on *Aeromonas* species (spp.). **Journal of Water and Health**, v. 7 Suppl 1, p. S29-54, 2009.

CLAMP, J. R.; HOUGH, L. The periodate oxidation of amino acids with reference to studies on glycoproteins. **The Biochemical Journal**, v. 94, p. 17–24, jan. 1965.

CLARK, R. B. et al. Attachment of mesophilic aeromonads to cultured mammalian cells. **Current Microbiology**, v. 19, n. 2, p. 97–102, ago. 1989.

COUTO, C. R. A. et al. Interactions of clinical and environmental *Aeromonas* isolates with Caco-2 and HT29 intestinal epithelial cells. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 405–410, out. 2007.

CORNELIS, G. R.; VAN GIJSEGEM, F. Assembly and function of type III secretory systems. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, p. 735–774, 2000.

COULTHURST, S. J. The Type VI secretion system – a widespread and versatile cell targeting system. **Research in Microbiology**, v. 164, n. 6, p. 640–654, jul. 2013.

CRAVIOTO, A. et al. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. **Current Microbiology**, v. 3, n. 2, p. 95–99, mar. 1979.

DOIG, P.; EMÖDY, L.; TRUST, T. J. Binding of laminin and fibronectin by the trypsin-resistant major structural domain of the crystalline virulence surface array protein of *Aeromonas salmonicida*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 1, p. 43–49, 5 jan. 1992.

DSMZ: Bacterial Nomenclature Up-to-Date, **Genus: *Aeromonas***. Disponível em: <[http://old.dsmz.de/microorganisms/bacterial\\_nomenclature\\_info.php?genus=Aeromonas&show\\_genus\\_info=1](http://old.dsmz.de/microorganisms/bacterial_nomenclature_info.php?genus=Aeromonas&show_genus_info=1)>. Acesso em: 23/01/2014.

DUTHIE, R.; LING, T. W.; CHENG, A. F.; FRENCH, G. L. *Aeromonas* septicaemia in Hong Kong species distribution and associated disease. **The Journal of infection**, v. 30, n. 3, p. 241–244, 1995.

ESTEVE, C.; ALCAIDE, E.; CANALS, R. et al. Pathogenic *Aeromonas hydrophila* serogroup O:14 and O:81 strains with an S layer. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 10, p. 5898–5904, 2004.

FANG, H.-M.; GE, R.; SIN, Y. M. Cloning, characterisation and expression of *Aeromonas hydrophila* major adhesin. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 16, n. 5, p. 645–658, 2004.

FERGUSON, M. R.; XU, X. J.; HOUSTON, C. W. et al. Hyperproduction, purification, and mechanism of action of the cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 10, p. 4299–4308, 1997.

FIGUERAS, M. J. Clinical relevance of *Aeromonas* sM503. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 145–156, 2005.

FINLAY, B. B.; SIEBERS, A. Mechanisms of mucosal colonization and penetration by bacterial pathogens. In: ROTH, J. A., BOLIN, C. A., BROGDEN, K. A., MINION, F. C. e WANNEMUEHLER, M. O. **Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens**. 2. ed. Washington: ASM Press, 1995. p. 33–45.

FRANCKI, K. T.; CHANG, B. J. Variable expression of O-antigen and the role of lipopolysaccharide as an adhesin in *Aeromonas sobria*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 122, n. 1–2, p. 97–101, 15 set. 1994.

FRANTZ, C.; STEWART, K. M.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 123, n. Pt 24, p. 4195–4200, 15 dez. 2010.

FRESHNEY, R. I. Defined media and supplements. In: \_\_\_\_\_. **Culture of animal cells – a manual of basic technique**. 5. ed. Nova Jersey: John, Wiley & Sons, 2005. p. 119.

- GALINDO, C L; GUTIERREZ, C., Jr; CHOPRA, A K. Potential involvement of galectin-3 and SNAP23 in *Aeromonas hydrophila* cytotoxic enterotoxin-induced host cell apoptosis. **Microbial Pathogenesis**, v. 40, n. 2, p. 56-68, 2006.
- GALINDO, C. L., SHA, J., FADL, A. A., PILLAI, L. L., CHOPRA, A. K. Host immune responses to *Aeromonas* virulence factors. **Current Immunology Reviews**. v. 2,p. 13–26, 2006.
- GAVÍN, R.; RABAAN, A. A; MERINO, S; et al. Lateral flagella of *Aeromonas* species are essential for epithelial cell adherence and biofilm formation. **Molecular Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 383-397, 2002.
- GERLACH, R. G.; HENSEL, M. Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens. **International Journal of Medical Microbiology: IJMM**, v. 297, n. 6, p. 401–415, out. 2007.
- GREY, P. A.; KIROV, S. M. Adherence to HEp-2 cells and enteropathogenic potential of *Aeromonas* spp. **Epidemiology and Infection**, v. 110, n. 2, p. 279–287, abr. 1993.
- GRYLLOS, I. et al. Role of flm locus in mesophilic *Aeromonas* species adherence. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 1, p. 65–74, jan. 2001.
- GUIMARÃES, M. S. et al. *Aeromonas hydrophila* vacuolating activity in the Caco-2 human enterocyte cell line as a putative virulence factor. **FEMS Microbiology Letters**, v. 207, n. 2, p. 127–131, 5 fev. 2002
- HAIKO, J.; WESTERLUND-WIKSTRÖM, B. The Role of the Bacterial Flagellum in Adhesion and Virulence. **Biology**, v. 2, n. 4, p. 1242–1267, 25 out. 2013.
- HENKEL, J. S.; BALDWIN, M. R., BARBIERI, J. T. Toxins from Bacteria. **EXS**. 100: 1–29, 2010.
- HENRY, C. M.; HOLLVILLE, E.; MARTIN, S. J. Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry. **Methods**, v. 61, n. 2, p. 90–97, jun. 2013.
- ISBERG, R. R.; BARNES, P. Dancing with the host; flow-dependent bacterial adhesion. **Cell**, v. 110, n. 1, p. 1–4, 12 jul. 2002.
- JANDA, J M. Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity, and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 4, n. 4, p. 397-410, 1991.
- JANDA, J M; ABBOTT, S L. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding Panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. **Clinical Infectious Diseases**: v. 27, n. 2, p. 332-344, 1998.

JANDA, J M; DUFFEY, P. S. Mesophilic aeromonads in human disease: current taxonomy, laboratory identification, and infectious disease spectrum. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 10, n. 5, p. 980-997, 1988.

JANDA, J. M; ABBOTT, S. L. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 1, p. 35-73, 2010.

KAISER'S MICROBIOLOGY HOME PAGE: **Virulence factors that promote colonization of the host**. 2012 Disponível em:  
<<http://faculty.ccbcmd.edu/courses/bio141/lecguide/unit2/bacpath/invoke.html>>.  
Acesso em: 10/01/2012.

KANONENBERG, K.; SCHWARZ, C. K. W.; SCHMITT, L. Type I secretion systems – a story of appendices. **Research in Microbiology**, v. 164, n. 6, p. 596–604, jul. 2013.

KAO, H. T.; HUANG, Y. C.; LIN, T. Y. Fatal bacteremic pneumonia caused by *Aeromonas hydrophila* in a previously healthy child. **Journal of Microbiology, Immunology, and Infection**. v. 36, n. 3, p. 209-211, 2003.

KHAJANCHI, B. K; FADL, A. A; BORCHARDT, M. A. et al. Distribution of virulence factors and molecular fingerprinting of *Aeromonas* species isolates from water and clinical samples: suggestive evidence of water-to-human transmission. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 7, p. 2313-2325, 2010.

KIENZLE, N.; MULLER, M.; PEGG, S. *Aeromonas* wound infection in burns. **Burns: journal of the International Society for Burn Injuries**, v. 26, n. 5, p. 478-482, 2000.

KIM, M.; ASHIDA, H.; OGAWA, M. et al. Bacterial interactions with the host epithelium. **Cell Host & Microbe**, v. 8, n. 1, p. 20-35, 2010.

KINGOMBE C. I, HUYS G, TONOLLA M, ALBERT M. J, SWINGS J, PEDUZZI R, JEMMI T. PCR detection, characterization, and distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 12, p. 5293-5302, dez. 1999.

KIROV, S M; BARNETT, T. C.; PEPE, C. M.; STROM, M. S.; ALBERT, M. J. Investigation of the role of type IV *Aeromonas pilus* (Tap) in the pathogenesis of *Aeromonas* gastrointestinal infection. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 7, p. 4040-4048, 2000.

KIROV, S M; HAYWARD, L. J.; NERRIE, M. A. Adhesion of *Aeromonas* sp. to cell lines used as models for intestinal adhesion. **Epidemiology and Infection**, v. 115, n. 3, p. 465-473, 1995.

KIROV, S. M.; JACOBS, I.; HAYWARD, L. J.; HAPIN, R. H. Electron microscopic examination of factors influencing the expression of filamentous surface structures on

clinical and environmental isolates of *Aeromonas veronii* Biotype sobria.  
**Microbiology and Immunology**, v. 39, n. 5, p. 329-338, 1995

KIROV, S M; O'DONOVAN, L A; SANDERSON, K. Functional characterization of type IV pili expressed on diarrhea-associated isolates of *Aeromonas* species.  
**Infection and Immunity**, v. 67, n. 10, p. 5447-5454, 1999.

KIROV, S. M.; SANDERSON, K. Characterization of a type IV bundle-forming pilus (SFP) from a gastroenteritis-associated strain of *Aeromonas veronii* biovar sobria.  
**Microbial Pathogenesis**, v. 21, n. 1, p. 23-34, 1996.

KIROV, S. M. Bacteria that express lateral flagella enable dissection of the multifunctional roles of flagella in pathogenesis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 224, n. 2, p. 151-159, 2003.

KIROV, S. M; CASTRISIOS, M.; SHAW, J. G. *Aeromonas* flagella (polar and lateral) are enterocyte adhesins that contribute to biofilm formation on surfaces. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 4, p. 1939-1945, 2004.

KIROV, SYLVIA M; TASSELL, B. C.; SEMMLER, A. B. T. et al. Lateral flagella and swarming motility in *Aeromonas* species. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 2, p. 547-555, 2002.

KLEINMAN, H. K. et al. Basement membrane complexes with biological activity. **Biochemistry**, v. 25, n. 2, p. 312–318, 28 jan. 1986.

KLEMM, P.; SCHEMBRI, M. A. Bacterial adhesins: function and structure. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 290, n. 1, p. 27–35, mar. 2000.

KLINE, K. A.; FÄLKER, S.; DAHLBERG, S.; NORMARK, S.; HENRIQUES-NORMARK, B. Bacterial adhesins in host-microbe interactions. **Cell Host & Microbe**, v. 5, n. 6, p. 580-592, 2009.

KRZYMINSKA, S.; TANSKA, A.; KAZNOWSKI, A. *Aeromonas* spp. induce apoptosis of epithelial cells through an oxidant-dependent activation of the mitochondrial pathway. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. Pt 7, p. 889–898, jul. 2011.

MARTIN, S. J.; HENRY, C. M. Distinguishing between apoptosis, necrosis, necroptosis and other cell death modalities. **Methods**, v. 61, n. 2, p. 87–89, jun. 2013.

MARTIN-CARNAHAN, A.; JOSEPH, S. W. *Aeromonadales* ord. nov. In: BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. et al. **Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology – The Proteobacteria**. 2. ed. New York: Springer, 2005. p.556-587.

MENCACCI, A.; CENCI, E.; MAZZOLLA, R. et al. *Aeromonas veronii* biovar veronii septicaemia and acute suppurative cholangitis in a patient with hepatitis B. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, n. Pt 8, p. 727-730, 2003.

- MERINO, S.; RUBIRES, X.; AGUILAR, A.; ALBERTÍ, S. et al. Mesophilic *Aeromonas* sp. serogroup O:11 resistance to complement-mediated killing. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 12, p. 5302-5309, 1996 a.
- MERINO, S.; RUBIRES, X.; AGUILAR, A.; TOMÁS. The O:34-antigen lipopolysaccharide as an adhesin in *Aeromonas hydrophila*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 139, n. 2-3, p. 97-101, 1996 b.
- MERINO, S.; RUBIRES, X.; AGUILAR, A.; TOMÁS, J M. The role of flagella and motility in the adherence and invasion to fish cell lines by *Aeromonas hydrophila* serogroup O:34 strains. **FEMS Microbiology Letters**, v. 151, n. 2, p. 213-217, 1997.
- MERINO, S.; RUBIRES, X.; AGUILLAR, A.; GUILLOT, J. F.; TOMÁS, J M. The role of the O-antigen lipopolysaccharide on the colonization in vivo of the germfree chicken gut by *Aeromonas hydrophila* serogroup O:34. **Microbial Pathogenesis**, v. 20, n. 6, p. 325-333, 1996 c.
- MESSNER, P.; SCHÄFFER, C.; EGELSEER, E. M.; SLEYTR, U. B. Occurrence, Structure, Chemistry, Genetics, Morphogenesis, and Functions of S-Layers. In: KÖNIG, H.; CLAUS, H.; VARMA, A. **Prokaryotic Cell Wall Compounds**. Berlin: Springer, 2010. p. 53-109.
- MONAGHAN, S. F.; ANJARIA, D.; MOHR, A.; LIVINGSTON, D. H. Necrotizing fasciitis and sepsis caused by *Aeromonas hydrophila* after crush injury of the lower extremity. **Surgical Infections**, v. 9, n. 4, p. 459-467, 2008.
- NAMBA, A.; MANO, N.; TAKANO, H. et al. OmpA is an adhesion factor of *Aeromonas veronii*, an opportunistic pathogen that habituates in carp intestinal tract. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, n. 5, p. 1441-1451, 2008.
- NAMDARI, H.; BOTTONE, E. J. Correlation of the suicide phenomenon in *Aeromonas* species with virulence and enteropathogenicity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 12, p. 2615–2619, dez. 1988.
- NATARO, J. P.; KAPER, J. B.; ROBINS-BROWNE, R. et al. Patterns of adherence of *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Pediatric Infectious Diseases Journal**, v. 6, p. 829-831, 1987.
- NEVES, M. S.; NUNES, M. P.; MILHOMEM, A. M. *Aeromonas* species exhibit aggregative adherence to HEp-2 cells. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 4, p. 1130–1131, abr. 1994.
- NISHIKAWA, Y.; KIMURA, T.; KISHI, T. Mannose-resistant adhesion of motile *Aeromonas* to INT407 cells and the differences among isolates from humans, food and water. **Epidemiology and Infection**, v. 107, n. 1, p. 171–179, ago. 1991.
- NISHIKAWA, Y.; HASE, A.; OGAWASARA, J. et al. Adhesion to and invasion of human colon carcinoma Caco-2 cells by *Aeromonas* strains. **Journal of Medical Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 55-61, 1994.



NOTHAFT, H.; SZYMANSKI, C. M. Protein glycosylation in bacteria: sweeter than ever. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 8, n. 11, p. 765–778, nov. 2010.

OKOCHI, M.; YOKOKAWA, H.; TAE KYU, L.; TAGUCHI, T.; TAKAHASHI, H.; YOKOUCHI, H.; KAIHO, T.; SAKUMA, A.; MATSUNAGA, T. Disinfection of microorganisms by use of electrochemically regenerated periodate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 10, p. 6410-6413, Outubro 2005.

OLSEN, J. V.; ONG, S.-E.; MANN, M. Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. **Molecular & cellular proteomics: MCP**, v. 3, n. 6, p. 608–614, jun. 2004.

OTTAVIANI, D. et al. Putative virulence properties of *Aeromonas* strains isolated from food, environmental and clinical sources in Italy: a comparative study. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 3, p. 538–545, 5 jan. 2011.

PACE, J. L.; CHAI, T. J.; ROSSI, H. A.; JIANG, X. Effect of bile on *Vibrio parahaemolyticus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 6, p. 2372–2377, 1997.

PAL, A. et al. Virulence traits of *Aeromonas* strains in relation to species and source of isolation. **Zentralblatt für Bakteriologie: international journal of medical microbiology**, v. 276, n. 3, p. 418–428, fev. 1992.

PALUMBO, S. A.; MAXINO, F.; WILLIAMS, A. C.; BUCHANAN, R. L.; THAYER, D. W. Starch-Ampicillin Agar for the Quantitative Detection of *Aeromonas hydrophila*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1027-1030, 1985.

PARKER, J. L.; SHAW, JONATHAN G. *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease. **The Journal of Infection**, v. 62, n. 2, p. 109-118, 2011.

PARKER, J. L. et al. Identification of a putative glycosyltransferase responsible for the transfer of pseudaminic acid onto the polar flagellin of *Aeromonas caviae* Sch3N. **MicrobiologyOpen**, v. 1, n. 2, p. 149–160, jun. 2012.

PARRAS, F.; DÍAZ, M. D.; REINA, J. et al. Meningitis due to *Aeromonas* species: case report and review. **Clinical Infectious Diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 17, n. 6, p. 1058-1060, 1993.

PAULSSON, M. et al. Laminin-nidogen complex. Extraction with chelating agents and structural characterization. **European Journal of Biochemistry / FEBS**, v. 166, n. 1, p. 11–19, 1 jul. 1987.

PEMBERTON, J. M.; KIDD, S. P.; SCHMIDT, R. Secreted enzymes of *Aeromonas*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 152, n. 1, p. 1–10, 1 jul. 1997.

PIAZZA, R. M. F.; ABE, C. M.; HORTON, D. S. P. et al. Detection and subtyping methods of diarrheagenic *Escherichia coli* strains. IN: TORRES, A. G. **Pathogenic Escherichia coli in Latin America**. [S.l.]: Bentham e Books, 2010. p. 105-108

PINNA, A.; SECHI, L. A.; ZANETTI, S.; USAI, D.; CARTA, F. *Aeromonas caviae* keratitis associated with contact lens wear. **Ophthalmology**, v. 111, n. 2, p. 348-351, 2004.

PIZARRO-CERDÁ, J.; COSSART, P. Bacterial adhesion and entry into host cells. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 715–727, 24 fev. 2006.

POWER, P. M.; JENNINGS, M. P. The genetics of glycosylation in Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 218, n. 2, p. 211–222, 28 jan. 2003.

PREISSNER, K. T.; CHHATWAL, G. S. Extracellular matrix and host cell surface: potential sites of pathogen interaction. In: COSSART, P.; BOQUET, P.; NORMARK, S.; RAPPUOLI, R. **Cellular Microbiology**. Washington DC: ASM Press, 2000. p. 49-66.

PUTHUCHEARY, S. D.; PUAH, S. M.; CHUA, K. H. Molecular characterization of clinical isolates of *Aeromonas* species from Malaysia. **PloS One**, v. 7, n. 2, p. e30205, 2012.

RABAAN, A A; GRYLLOS, I; TOMÁS, J M; SHAW, J G. Motility and the polar flagellum are required for *Aeromonas caviae* adherence to HEp-2 cells. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 7, p. 4257-4267, 2001.

RANHAND, J. M. Inhibition of transformation by sodium metaperiodate in *Streptococcus sanguis* (Wicky): demonstration that deoxyribonucleic acid binding sites contain amino acids. **Journal of Bacteriology**, v. 118, n. 3, p. 1192–1193, jun. 1974.

ROBERTS, M. T. M.; ENOCH, D. A.; HARRIS, K. A.; KARAS, J. A. *Aeromonas veronii* biovar sobria bacteraemia with septic arthritis confirmed by 16S rDNA PCR in an immunocompetent adult. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. Pt 2, p. 241-243, 2006.

ROCHA-DE-SOUZA, C. M.; COLOMBO, A. V.; HIRATA, R. et al. Identification of a 43-kDa outer-membrane protein as an adhesin in *Aeromonas caviae*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 313-319, 2001.

ROSENZWEIG, J. A.; CHOPRA, A. K. Modulation of host immune defenses by *Aeromonas* and *Yersinia* species: convergence on toxins secreted by various secretion systems. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, p. 70, 2013.

ROSKAMS, J.; RODGERS, L. Section 1B: biological buffers. In: \_\_\_\_\_ . **Lab Ref: a handbook of recipes, reagents, and other reference tools for use at the bench**. Nova Iorque: Cold Spring Harbor, 2002. p. 18.

SAIDI, N. Adhesive properties of *Aeromonas hydrophila* strains isolated from Tunisian aquatic biotopes. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 31, 23 dez. 2011.

SALYERS, A. A, WHITT, D. Bacterial strategies for evading or surviving the defense systems of the human body. In: \_\_\_\_\_ **Bacterial pathogenesis: a molecular approach**. 2. ed. Washington, D.C: ASM Press, 2002. p. 115-124

SCALETSKY, I. C. A. et al. HEp-2-adherent *Escherichia coli* strains associated with acute infantile diarrhea, São Paulo, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 8, p. 855–858, ago. 2002.

SEMEL, J. D.; TRENHOLME, G. *Aeromonas hydrophila* water-associated traumatic wound infections: a review. **The Journal of Trauma**, v. 30, n. 3, p. 324-327, 1990.

SHA, JIAN; KOZLOVA, E. V.; CHOPRA, A K. Role of various enterotoxins in *Aeromonas hydrophila*-induced gastroenteritis: generation of enterotoxin gene-deficient mutants and evaluation of their enterotoxic activity. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 4, p. 1924-1935, 2002.

SHA, JIAN; PILLAI, L.; FADL, AMIN A; et al. The type III secretion system and cytotoxic enterotoxin alter the virulence of *Aeromonas hydrophila*. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 10, p. 6446-6457, 2005.

SHA, JIAN; WANG, S. F.; SUAREZ, G; et al. Further characterization of a type III secretion system (T3SS) and of a new effector protein from a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*-part I. **Microbial Pathogenesis**, v. 43, n. 4, p. 127-146, 2007.

SIERRA, JOHANNA C; SUAREZ, GIOVANNI; SHA, JIAN; et al. Biological characterization of a new type III secretion system effector from a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*-part II. **Microbial Pathogenesis**, v. 43, n. 4, p. 147-160, 2007.

SILVA, P. H.; HASHIMOTO, Y.; ALVES, H. B. Fase pré-analítica. In: \_\_\_\_\_. **Hematologia laboratorial**. Rio de Janeiro: Revinter, 2009. p. 12-13.

SILVERMAN, J. M. et al. Structure and Regulation of the Type VI Secretion System. **Annual Review of Microbiology**, 28 jun. 2012.

SUAREZ, G; SIERRA, J C; EROVA, T E; et al. A type VI secretion system effector protein, VgrG1, from *Aeromonas hydrophila* that induces host cell toxicity by ADP ribosylation of actin. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 1, p. 155-168, 2010.

SUAREZ, GIOVANNI; SIERRA, JOHANNA C; SHA, JIAN; et al. Molecular characterization of a functional type VI secretion system from a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*. **Microbial Pathogenesis**, v. 44, n. 4, p. 344-361, 2008.

ŠTYRIAK, I.; LJUNGH, S. Binding of extracellular matrix molecules by enterococci. **Current Microbiology**, v. 46, n. 6, p. 435–442, jun. 2003.

SUN, J. et al. Association of *Lactobacillus acidophilus* with mice Peyer's patches. **Nutrition**, v. 26, n. 10, p. 1008–1013, out. 2010.

TABEI, S. M. B. et al. An *Aeromonas caviae* genomic island is required for both O-antigen lipopolysaccharide biosynthesis and flagellin glycosylation. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 8, p. 2851–2863, abr. 2009.

THORNLEY, J. P. et al. Adherence of *Aeromonas caviae* to human cell lines Hep-2 and Caco-2. **Journal of Medical Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 445–451, dez. 1996.

THORNLEY, J. P.; SHAW, J. G.; GRYLLOS, I. A.; ELEY, A. Virulence properties of clinically significant *Aeromonas* species: evidence for pathogenicity. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 8, n. 2, abril 1997.

TOMÁS, J. M. The main *Aeromonas* pathogenic factors. **ISRN Microbiology**, v. 2012, p. 256261, 2012.

TOSI, T. et al. Structural basis of eukaryotic cell targeting by type III secretion system (T3SS) effectors. **Research in Microbiology**, v. 164, n. 6, p. 605–619, jul. 2013.

UDEY, L. R.; FRYER, J. L. Immunization of fish with bacterins of *Aeromonas salmonicida*. **Marine Fisheries Review**, v. 40, n. 3, p. 12-17, 1978.

VÀZQUEZ-JUÁREZ, R. C.; ROMERO, M. J.; ASCENCIO, F. Adhesive properties of a LamB-like outer-membrane protein and its contribution to *Aeromonas veronii* adhesion. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n. 4, p. 700–708, 2004.

VILCHES, S. et al. Complete type III secretion system of a mesophilic *Aeromonas hydrophila* strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 11, p. 6914–6919, nov. 2004.

VIZZOTTO, B. S. **Caracterização fenotípica e molecular de estirpes de *Aeromonas* isoladas no Paraná no período de 1999-2009**. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

VOSS, L. M.; RHODES, K. H.; JOHNSON, K. A. Musculoskeletal and soft tissue *Aeromonas* infection: an environmental disease. **Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic**, v. 67, n. 5, p. 422-427, 1992.

WAKABONGO, M. Motile *Aeromonas* as agent of infections of the foot. **Journal of the American Podiatric Medical Association**, v. 85, n. 9, p. 505-508, 1995.

WANDERSMAN, C. Concluding remarks on the special issue dedicated to Bacterial secretion systems: function and structural biology. **Research in Microbiology**, v. 164, n. 6, p. 683–687, jul. 2013.

WILMSEN, H. U.; PATTUS, F.; BUCKLEY, J. T. Aerolysin, a hemolysin from *Aeromonas hydrophila*, forms voltage-gated channels in planar lipid bilayers. **The Journal of Membrane Biology**, v. 115, n. 1, p. 71-81, 1990.

WILSON, J. W. et al. Mechanisms of bacterial pathogenicity. **Postgraduate Medical Journal**, v. 78, n. 918, p. 216–224, abr. 2002.

WINN, W. C.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; KONEMAN, E. W. et al. **Medical Bacteriology: taxonomy, morphology, physiology, and virulence**. In: \_\_\_\_\_. **Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. 6. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. p. 167-207.

WOLF, S. **Características de virulência em estirpes de *Aeromonas* spp.** 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

WU, H.-J.; WANG, A. H.-J.; JENNINGS, M. P. Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, n. 1, p. 93–101, fev. 2008.

ZHANG, Y. L.; ARAKAWA, E.; LEUNG, K. Y. Novel *Aeromonas hydrophila* PPD134/91 genes involved in O-antigen and capsule biosynthesis. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 5, p. 2326-2335, 2002.

ZULFAKAR, S. S. et al. Bacterial attachment to immobilized extracellular matrix proteins in vitro. **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, n. 2, p. 210–217, jul. 2012.

YU, H. B.; RAO, P. S. S.; LEE, H. C. et al. A type III secretion system is required for *Aeromonas hydrophila* AH-1 pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 3, p. 1248-1256, 2004

